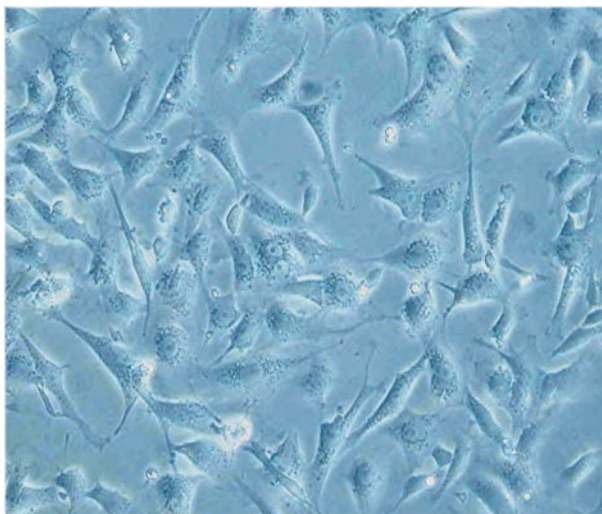


UNTERSUCHUNGEN ZUR BILDUNG, REGRESSION UND FUNKTIONALITÄT DES CORPUS LUTEUM DER NICHT GRAVIDEN HÜNDIN, MORPHOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE ASPEKTE

MARIUSZ SONNACK



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin,
Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß-
und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz
und
aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und –Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Giessen
Betreuer: Prof. Dr. Dr. h. c. Bernd Hoffmann
Prof. Dr. Dr. h. c. Rudolf Leiser

**Untersuchungen zur Bildung, Regression und
Funktionalität des Corpus luteum der nicht graviden
Hündin, morphologische und biochemische Aspekte**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

eingereicht von

Mariusz Sonnack
Tierarzt aus Olsztyn/Polen

Giessen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil G. Baljer

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd Hoffmann

Prof. Dr. Dr. h.c. Rudolf Leiser

Prof. Dr. Martin Diener

Tag der mündlichen Prüfung: 13.03.2009

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG.....	1
2	LITERATURÜBERSICHT.....	3
2.1	Der canine Reproduktionszyklus.....	3
2.1.1	Proöstrus	3
2.1.2	Östrus	3
2.1.3	Diöstrus.....	3
2.1.4	Anöstrus.....	4
2.2	Derzeitiger Kenntnisstand zur Kontrolle der CL-Funktion beim Hund.....	4
2.3	Allgemeines zu Morphologie und Histologie des CL	7
2.3.1	Bildung und Differenzierung (Organisation) des CL	8
2.3.2	Regression des CL	10
2.4	Apoptose.....	11
2.4.1	Morphologie apoptotischer Zellen	11
2.4.2	Mechanismen der Apoptose	13
2.4.3	Vorkommen der Apoptose im CL	17
2.5	Luteale Steroide als auto-/parakrine Regelfaktoren	18
3	MATERIAL UND METHODEN.....	21
3.1	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	21
3.1.1	Versuchsaufbau	21
3.1.2	Probenaufbereitung.....	21
3.1.3	Fotografie	22
3.2	Immunhistochemischer (IHC) Nachweis der Apoptose.....	23
3.2.1	Versuchsaufbau	23
3.2.2	Fixierung und Einbettung der Proben.....	23
3.2.3	Vorbereitung für die IHC	23
3.2.4	Darstellung der Apoptose mittels anti-aktiver Caspase-3 Antikörper.....	24
3.2.5	Darstellung der Apoptose mittels TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)	25
3.2.6	Auswertung der gefärbten Gewebeschnitte	26
3.3	Primärkulturen mit Luteinzellen.....	27
3.3.1	Organpräparation und Isolierung der Zellen	27
3.3.2	Zellzahl und Vitalitäts-Bestimmung.....	28
3.3.3	Inkulturnahme isolierter Zellen	28
3.3.3.1	Verwendetes Kulturmedium.....	29
3.3.3.2	Medienwechsel	30
3.3.4	Bestimmung der Progesteron-Konzentration im Medium.....	30
3.3.5	Versuchsansätze nach Zusatz von Mifepriston (RU-38486) und 4-Hydroxytamoxifen.....	31
3.4	Materialien und Geräte	32
3.4.1	Verwendete Antikörper	32
3.4.2	Verwendete Medien, Puffer und Lösungen.....	32
3.4.3	Sonstige Reagenzien und Materialien	34
3.4.4	Auflistung besonderer Geräte.....	35
3.5	Statistische Auswertung	36

4	ERGEBNISSE.....	37
4.1	Elektronenmikroskopie.....	37
4.1.1	CL Tag 5 p. o. (Abb. 5 A, B).....	37
4.1.2	CL Tag 15 p. o. (Abb. 6 A, B).....	37
4.1.3	CL Tag 30 p. o. (Abb. 7A, B).....	42
4.1.4	CL Tag 45 p. o. (Abb. 8A, B).....	42
4.1.5	CL Tag 60 p. o. (Abb. 9A, B).....	45
4.1.6	CL Tage 75 und 113 p. o. (Abb. 10 A, B).....	45
4.2	Nachweis der Apoptose mittels anti-aktiver Caspase-3 Antikörper und TUNEL-Methode.....	47
4.3	Primärzellkultur.....	50
4.3.1	Gewinnung und Kultivierung der Luteinzellen.....	50
4.3.2	Ergebnisse der Progesteronmessung in Kontrollansätzen.....	53
4.3.3	Ergebnisse der Progesteronmessung nach alleinigem Zusatz von RU-38486 und 4-Hydroxytamoxifen.....	54
4.3.4	Ergebnisse der Progesteronmessung nach Zusatz von RU-38486 und 4-Hydroxytamoxifen in Kombination mit Cholesterol.....	55
5	DISKUSSION	57
5.1	Ausgangslage und Versuchsziel.....	57
5.2	Diskussion der Ergebnisse der Transmissionselektronenmikroskopie.....	59
5.2.1	Proliferation und Regression.....	59
5.2.2	Große- und kleine Luteinzellen.....	62
5.3	Diskussion der Ergebnisse zur Darstellung apoptotischer Zellen.....	63
5.4	Diskussion der Ergebnisse der Primärzellkultur.....	66
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	70
7	SUMMARY.....	72
8	LITERATURVERZEICHNIS	75

Abkürzungen

Abb	Abbildung
Abs	Abschnitt
AIF	Apoptosis Inducing Factor
APaf-1	Apoptotic Protease-Activating Factor-1
Aqua dest	Aqua destillata
3 β -HSD	3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase
CD4	T-Helfer-Lymphozyten
CAD	Caspase Aktivated DNase
CARD	Caspase Recruiting Domäne
CD8	T-Suppressor-Lymphozyten
CD95	Todesrezeptor
ced	Caenorhabditis elegans death gene
CL	Corpus luteum
DAB	Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DED	Death Effector Domain
DD	Death Domain
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DMP	2, 4, 6 Tri (dimethylaminomethyl)phenol
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
dUTP	Desoxyuridin-Triphosphat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FADD	Fas Associated Death Domain
FKS	Fetales Kälberserum
HCG	Humanes Choriongonadotropin
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IAPs	Inhibitor of Apoptosis Protein
ICE	Interleukin-1 β converting Enzyme
IL	Interleukin
Kap.	Kapitel
LH	Luteinisierendes Hormon
MHC	Major Histocompatibility
OHE	Ovariohysterektomie
PBS	Phosphate buffered saline
PGF2 α	Prostaglandin F-2 alpha
PKC	Protein kinase C
p. o.	post ovulationem
p. c.	post coitum
P450 scc	P450 side chaine cleavage
s.	siehe
s.o.	siehe oben
StAR	Steroide Acute Regulatory Protein
TGF- β	Transforming- Growth-Factor-beta
TdT	Terminale Desoxynukleotidyltransferase
TNF- α	Tumor-Nekrose-Factor-alpha
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Der Zyklus der Hündin weist im Vergleich zu anderen Haussäugetieren zahlreiche Besonderheiten auf. So ist die Luteolyse von Faktoren uterinen Ursprungs unabhängig, nur in der unmittelbaren präpartalen Phase scheint Prostaglandin F2 alpha ($\text{PGF}_2\alpha$) als luteolytischer Faktor zu wirken (HOFFMANN et al., 1996). Nach HOFFMANN et al. (2004a) und KOWALEWSKI & HOFFMANN (2008) handelt es sich bei der Regression der Corpora lutea (CL) der ingraviden Hündinnen um keinen aktiven Prozess; als rate-limiting step für die Progesteronsynthese ist die im Verlauf des Diöstrus abnehmende Verfügbarkeit des Steroid Acute Regulatory Protein (StAR) anzusehen (KOWALEWSKI & HOFFMANN (2008).

Durch die Luteolyse verliert das CL seine Fähigkeit zur Progesteronsynthese, so dass es zu einem Abfall der Progesteronkonzentration im Blutplasma kommt. Weiterhin kommt es zu Veränderungen im histomorphologischen Aufbau der CL und zur Degeneration der Luteinzellen. Um ein besseres Verständnis der Regulationsmechanismen der Luteolyse zu bekommen, befassten sich vorliegende Untersuchungen mit den morphologischen Veränderungen des lutealen Gewebes, das mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersucht wurde.

Der programmierte Zelltod wurde als physiologischer Prozess bei der zyklischen Regression des CL bei Schaf (SAWYER et al., 1990), Rind (JUENGEL et al., 1993; ZHENG et al., 1994), Hase (DHARMARAJAN et al., 1994), Hamster (McCORMACK et al., 1998), Ratte (BRUCE et al., 2001; MATSUYAMA et al., 1996) und bei der Stute (AL-ZI'ABI et al., 2002) nachgewiesen. Den vorliegenden Untersuchungen lag die Hypothese zu Grunde, dass auch beim Hund die Apoptose ein wichtiger Regelfaktor der lutealen Regression ist. Das Vorkommen der Apoptose wurde mittels zweier immunhistochemischer Verfahren, der Caspase-3- sowie der TUNEL-Methode, untersucht.

HOFFMANN et al. (1996) postulierten, dass bei der Regulation des CL möglicherweise parakrine und autokrine Steuerungsmechanismen eine Rolle spielen. Die Untersuchungen von DE CARVALHO PAPA (2001) und HOFFMANN et al. (2004a) haben auf eine mögliche Bedeutung von lutealem Progesteron und Estradiol-17 β als para-/autokrine Faktoren bei der Regression der CL hingewiesen, nachdem Östrogen- und Progesteronrezeptoren im CL der Hündin sowohl immunhistologisch und zwischenzeitlich auch mittels der RT-PCR (DE CARVALHO PAPA et al. unveröffentlichte Ergebnisse) nachgewiesen werden konnten.

Ein weiteres Ziel unserer Arbeit war daher die Etablierung einer Primärzellkultur und die Untersuchung ihrer endokrinen Funktionen. Im Hinblick auf die Bedeutung der lutealen Steroidhormone Progesteron und Estradiol-17 β bei der Steuerung der CL Funktion sollte unter definierten Bedingungen die Fähigkeit der Luteinzellen zur Progesteronsynthese untersucht werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Der canine Reproduktionszyklus

Der Reproduktionszyklus bei der Hündin wird als asaisonal und monöstrisch bezeichnet. Die Zyklusphasen der Hündin ergeben sich, entsprechend der Einteilung von FELDMANN & NELSON (1987), wie folgt:

2.1.1 Proöstrus

Der Proöstrus ist der Zeitraum von Beginn der proöstrischen Blutung bis zum Beginn der Sexualakzeptanz und dauert 3-16 Tage. Unter dem Einfluss von Östrogenen erfolgt eine Ödematisierung von Vulva und Perinaeum sowie Hyperämie der Vaginalschleimhaut (ARBEITER, 1994). Die Konzentration von Estradiol-17 β im Blutplasma steigt bis auf Maximalwerte von ca. 100 pg/ml an (Abb. 1).

2.1.2 Östrus

Der Östrus der Hündin beginnt mit der Akzeptanz des Rüden und dauert zirka 4-12 Tage. Die Estradiol-17 β -Konzentration im Blutplasma, die schon gegen Ende des Proöstrus absinkt, nimmt weiter ab, gleichzeitig steigt die Progesteronkonzentration. Der Tag der Ovulation wird gängigerweise als der Tag definiert, an dem die Konzentration von Progesteron im Plasma gleich oder größer 5 ng/ml ist (BOUCHARD et al., 1991; CONCANNON, 1993) (Abb. 1).

2.1.3 Diöstrus

Der Diöstrus ist durch den Verlust der Akzeptanz des Rüden gekennzeichnet (ARBEITER, 1994). Die Dauer dieses Zeitraumes schwankt zwischen 60 bis 90 Tagen. Die Progesteronkonzentration steigt bis zum ca. 20. Tag post ovulationem (p. o.) auf Maximalwerte von etwa 30 ng/ml und beginnt dann langsam wieder abzufallen. In der

zweiten Hälfte des Diöstrus steigt die Verfügbarkeit von Prolaktin und luteinisierendem Hormon (LH) an (HOFFMANN et al., 1999).

2.1.4 Anöstrus

Der Anöstrus wird als die Ruhephase des Reproduktionszyklus definiert. Die Progesteronwerte im Blutplasma sinken unter 1 ng/ml. Die Länge des Anöstrus kann zwischen 15 und 256 Tagen variieren (ARBEITER, 1994).

2.2 Derzeitiger Kenntnisstand zur Kontrolle der CL-Funktion beim Hund

Der Zyklus der Hündin weist im Vergleich zu anderen Haussäugetieren zahlreiche Besonderheiten auf. Die Hormonprofile von Progesteron, Estradiol-17 β und LH verlaufen bei graviden und ingraviden Hündinnen nahezu identisch mit der Ausnahme, dass sich der nahende Geburtstermin mit einem plötzlich einsetzenden Progesteronabfall ankündigt (Abb. 1) (HOFFMANN et al., 1992; CONCANNON, 1993). Etwa während der ersten 20 Tage p. o. ist das CL bei der Hündin unabhängig von hypophysären gonadotropen Stimuli, da weder nach Hypophysektomie (CONCANNON 1980; OKKENS et al., 1986) noch nach Ausschaltung von LH und Prolaktin (CONCANNON et al., 1987) in diesem Zeitraum nachhaltige Funktionsänderungen beobachtet werden; danach wirken Prolaktin und LH als luteotrope Faktoren. So führt in diesem Zeitraum eine Hypophysektomie zu einem Abfall der Progesteronkonzentration im Plasma (CONCANNON, 1980). Im Vordergrund stehender luteotroper Faktor ist Prolaktin (OKKENS & BEVERS, 1990; ONCLIN & VERSTEGEN, 1997a), da nicht die Ausschaltung von LH sondern von Prolaktin, z. B. nach dem Einsatz von Dopaminagonisten, zu einem nachhaltigen Abfall der Progesteronsekretion führt (OKKENS & BEVERS, 1990).

Zur Regulation der lutealen Regression bei der nicht graviden Hündin konnten erst in jüngster Zeit nähere Angaben erhalten werden. Anders als bei den landwirtschaftlichen

Nutztieren ist die Luteolyse bei nicht graviden Hündinnen unabhängig von Faktoren uterinen Ursprungs (OLSON et al., 1989; HOFFMANN et al., 1992), da eine Hysterektomie keinen Einfluss auf die Lebensspanne der CL hatte. Allerdings konnten HOFFMANN et al. (1996) nach Hemmung von $\text{PGF}_2\alpha$ durch Anwendung des Cyclooxygenasehemmers Indometacin eine Verlängerung der Tragezeit erreichen, so dass sie daraus schlossen, dass zumindest der rasche Progesteronabfall ante partum $\text{PGF}_2\alpha$ vermittelt ist. In Übereinstimmung damit konnten WILLIAMS et al. (1999) nach Verabreichung des $\text{PGF}_2\alpha$ -Analogons Na-Cloprostenol bei graviden Hündinnen eine vorzeitige Luteolyse induzieren. Allerdings konnte auch bei nicht graviden Hündinnen durch wiederholte $\text{PGF}_2\alpha$ Anwendung eine Luteolyse induziert werden (CONCANNON & HANSEL, 1977). Der Frage, ob und inwieweit Prostaglandine auf para-/autokriner Ebene an der Regulation der CL-Funktion beteiligt sind, gingen KOWALEWSKI et al. (2006a, b; 2008a, b) nach. Diese Untersuchungen ergaben, dass im CL der nicht graviden Hündin sowohl Cyclooxygenase (Cox) 1 als auch Cox 2 exprimiert werden, wobei jedoch lediglich die Expression von Cox 2 mit einem Maximum im ersten Drittel des Diöstrus eine Zyklusabhängigkeit aufwies. Die parallel dazu erhöhte Expression von Prostaglandin E-Synthase lässt auf eine erhöhte Synthese von PGE_2 schließen und auf eine luteotrope Wirkung dieses Stoffes auch beim Hund. Eine Expression von Prostaglandin F-Synthase konnte nicht nachgewiesen werden, dagegen die Expression von Rezeptoren für $\text{PGF}_2\alpha$ als auch PGE_2 . Mit diesem Befund erklären KOWALEWSKI et al. (2008a, b) die durch eine exogene $\text{PGF}_2\alpha$ -Zufuhr induzierbare Luteolyse bei der Hündin.

Daraus ergibt sich jedoch keine Erklärung für die endogenen, der Luteolyse bei der nicht graviden Hündin zugrunde liegenden Vorgänge.

So ist die Rückbildung des CL bei der nicht graviden Hündin nicht auf einen Mangel an Prolaktin und LH zurückzuführen, da diese beiden luteotropen Faktoren im späten Diöstrus

und frühen Anöstrus vermehrt freigesetzt werden (HOFFMANN & SCHNEIDER, 1993; ONCLIN & VERSTEGEN, 1997b) bei unveränderter Expression der lutealen LH- und Prolaktin-Rezeptoren (FERNANDES et al., 1987).

HOFFMANN et al. (1996) schlossen daher auf parakrine und autokrine Steuerungsmechanismen, die für die luteale Regression bei der nicht graviden Hündin verantwortlich sind. Eine solche Rolle kommt wahrscheinlich dem lutealen Progesteron und Estradiol-17 β zu, da sowohl Östrogen- als auch Progesteronrezeptoren immunhistologisch im CL nachgewiesen worden sind (DE CARVALHO PAPA, 2001; HOFFMANN et al., 2004a). Aus den Befunden von BÜSGES (2003), HOFFMANN et al. (2004a, b) sowie ENGEL (2004) lässt sich weiterhin schließen, dass die Luteolyse auch immunomodulatorischen Vorgängen unterliegt, da sowohl die Expression einer Reihe von Zytokinen im CL der Hündin als auch ein Anstieg an CD 8 positiven Lymphozyten und Makrophagen zum Zeitpunkt der beginnenden Luteolyse im CL der Hündin nachgewiesen werden konnten.

Neueste Untersuchungen haben gezeigt, dass die funktionelle Luteolyse auf einen Rückgang der Expression von StAR und 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (3 β HSD) zurückzuführen ist (KOWALEWSKI, 2007; KOWALEWSKI & HOFFMANN, 2008). Die Autoren schließen daraus, dass die Luteolyse beim ingraviden Hund keiner aktiven Steuerung unterliegt sondern eher einem normalen Alterungsprozess gleicht.

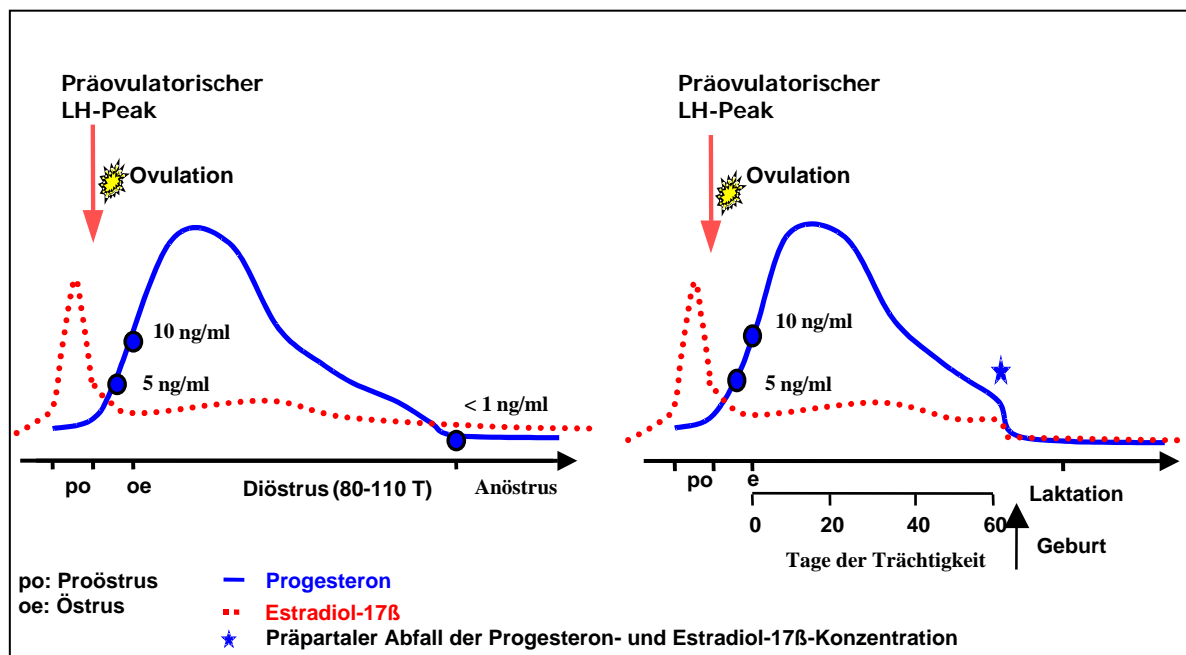


Abb. 1: Schematische Darstellung des Verlaufes von Progesteron und Estradiol-17β bei der graviden und ingraviden Hündin (HOFFMANN et al., 1999)

2.3 Allgemeines zu Morphologie und Histologie des CL

Das CL ist eine endokrine Drüse, die sich nach der Ovulation aus den verbliebenen Zellen der Follikelwand, das heisst den Granulosazellen und den Stromazellen der Theca folliculi interna, bildet. Die Neu- und Rückbildung eines CL vollzieht sich stets durch zelluläre, vaskuläre und bindegewebige Umbauvorgänge (Überblick bei PRIEDKALNS & LEISER, 1998). Schon während der späten präovulatorischen Phase setzen erste Veränderungen der Follikelzellen (Granulosazellen) und der Stromazellen der Theca interna ein, die nach der Ovulation weiter an Intensität zunehmen. Durch Vergrößerung des Zytoplasmas (funktionelle Hypertrophie) und durch Zellerneuerung (Hyperplasie) transformieren sich diese Zellen zu Luteinzellen. Nach Herkunft der Luteinzellen wird bei zahlreichen Spezies zwischen Granulosaluteinzellen und Thecaluteinzellen unterschieden (BLOOM & FAWCETT, 1975; LIEBICH, 1990; PRIEDKALNS & LEISER, 1998).

Während bei Rind, Schaf, Schwein, Pferd und Ratte (GREGORASZCZUK & KRZYSZTOFOWICZ 1989; FIELDS et al., 1992; McLEAN et al., 1992; BRANNIAN et al., 1993; FIELDS & FIELDS, 1996; AL-ZIÀBI et al., 2002) zahlreiche licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Morphologie der Luteinzellen durchgeführt worden sind, existieren für den Hund nur relativ wenige Mitteilungen (ANDERSEN & SIMPSON, 1973; DORE, 1989).

Nach diesen kann die strukturelle Entwicklung des CL der graviden Hündin, entsprechend den Abschnitten der Gravidität, in drei Phasen unterteilt werden: Bildung (Tage 0-20 post coitum (p. c.)), Differenzierung (Tage 21-44 p. c.), Regression (Tage 45-60 p. c.) (ANDERSEN & SIMPSON, 1973).

2.3.1 Bildung und Differenzierung (Organisation) des CL

Das frühe CL der Hündin unmittelbar nach der Ovulation besteht aus lichtmikroskopisch sichtbaren, zarten Luteinzell-Falten, die sich, aus der Tiefe der Follikelwand herauswachsend, in das Antrum vorwölben (ANDERSEN & SIMPSON, 1973). Die Falten bestehen aus Granulosaluteinzellen und sind gestützt von einem stark vaskularisierten, ödematisierten Bindegewebskern, der aus der Theca interna stammt. Durch Proliferation und Vergrößerung der Luteinzellen einerseits und Proliferation des vaskularisierten Bindegewebes andererseits, wachsen diese Luteinzell-Falten in das Antrum hinein. Darauf sprießen feine Bindegewebszüge, begleitet von einem Kapillarnetz, vom äußeren Rand des CL durch die Luteinzellschicht bis hin zum Antrum. Es bildet sich ein Gerüst, das als Ausgangspunkt für das weitere Wachstum dient.

Die Vaskularisation des CL bildet sich, indem nach einer Fragmentierung der Basalmembran zwischen den Basalzellen und der Theca follicularis interna Arteriolen und Kapillaren aus der Theca interna in die gefäßfreie Follikelwand einwachsen und von dort weiter unter Verzweigung in die ehemalige Follikelhöhle einsprießen. Über das sich

bildende Kapillarsystem wandern Stromazellen, Fibroblasten sowie immunkompetente Zellen wie Makrophagen, Monozyten, Granulozyten oder Lymphozyten in die Follikelhöhle ein und beginnen mit der Organisation des jungen CL (LIEBICH, 1990).

Lichtmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Luteinzellen zwischen dem 24. und 37. Tag zu maximaler Größe von 30-40 μm im Durchmesser heranwachsen. Sie haben eine polyedrische Form und sind besonders in der Anbildungsphase (5.- 45. Tag) von einem blass gefärbten Zwischenzellraum umgeben (ANDERSEN & SIMPSON, 1973). Die großen, ovalen, oft Kernkörperchen enthaltende Kerne sind perinukleär von Granula verschiedener Größe und filamentösen Strukturen umgeben. Der daran angrenzende Teil von Zytoplasma färbt sich hell an und enthält Vesikel von unterschiedlicher Zahl und Größe, welche die Sekretionsleistung der Zellen charakterisieren (ANDERSEN & SIMPSON, 1973). Mit voranschreitender Differenzierung des CL vermehren sich diese Vesikel; zwischen dem 24. und 37. Tag weisen die Luteinzellen ein Maximum an Einschlüssen auf. Die Zellen werden zu diesem Zeitpunkt von einem reichen Kapillarnetz umgeben, und sie bilden Zytoplasmafortsätze, mit denen sie benachbarte Zellen und Kapillaren kontaktieren können. Im Stadium der CL-Blüte stehen die Kapillarschlingen in engem Kontakt zu den Luteinzellen und nehmen Progesteron in das zirkulierende Blut auf (LIEBICH, 1990).

ANDERSEN und SIMPSON (1973) beschrieben bei graviden Hündinnen Unterschiede zwischen Granulosa- und Thecaluteinzellen. Die Granulosaluteinzellen sind polygonal und weisen einen Durchmesser bis zu 40 μm auf. Die Thecaluteinzellen sind fibroblastenähnlich, besitzen einen relativ großen Kern, haben eine längliche Form und eine Ausdehnung von lediglich 2-5 μm . Sie liegen vereinzelt zwischen den Granulosaluteinzellen und sind über das ganze CL verteilt. Elektronenmikroskopisch lassen sich deutliche Unterschiede in der Organellenstruktur dieser zwei Luteinzelltypen

erkennen (RHODIN, 1974; BLOOM & FAWCETT, 1975; PRIEDKALNS & LEISER, 1998). Granulosaluteinzellen fallen nach DORE (1989) beim Hund auf durch groß-ovale, euchromatinreiche Kerne mit 1-2 Nucleoli, die von Zytoplasma umgeben sind, das mit Mitochondrien vom Tubulus-Typ, viele glattem ER und zahlreichen Lipidtröpfchen ausgestattet ist (RHODIN, 1974). Das glatte ER und die Lipideinschlüsse bilden charakteristische Organellen-Komplexe, sogenannte Parasomen, die als Ort einer intensiven Hormonsynthese angesehen werden (DORE, 1989), was beim Schwein nach BJERSING (1967) und CAVAZOS et al. (1969) mit dem Zeitpunkt der maximalen Progesteronssekretion in Verbindung gebracht wurde. Die deutlich kleineren Thecaluteinzellen weisen aber bei relativ wenig Parasomen vermehrt Lipideinschlüsse auf (PRIEDKALNS & LEISER, 1998). Unbeschadet dieser Unterschiede geht LIEBICH (1990) davon aus, dass beide Zelltypen letztlich ähnliche Funktion haben.

2.3.2 Regression des CL

Untersuchungen von ANDERSEN & SIMPSON (1973) bei graviden Hündinnen haben gezeigt, dass die frühe Regression des CL graviditatis etwa ab Tag 45 p. c. beginnt. Die Luteinzellen verkleinern sich und die Kerne beginnen zu schrumpfen. Durch Anschwellung der Gefäßwände tritt eine Einengung und letztlich der Verschluss der Gefäßlumina ein, wodurch einige Kapillaren im Zentrum des CL undurchlässig werden. Die flüssigkeitsgefüllten Hohlräume enthalten Zelltrümmer und Erythrozyten. Am 56. Tag p. c. sind verschiedene Stadien der Degeneration sichtbar. Auffällig ist das Auftreten von zytoplasmatischen Granula, die an Zahl und Größe zunehmen. Parallel dazu werden die Parasomen undeutlicher, und nach und nach verschwinden die Zellorganellen. Am 58. und 60. Tag zeigen die meisten Zellen Merkmale der Degeneration, wie Kernpyknose, Kernzerfall, eine undeutlichere Kernmembran als vorher und einen hellen perinukleären Bereich. Im Zytoplasma werden viele Vesikel beobachtet, Parasomen fehlen. Begleitet

werden diese Prozesse von einer Zunahme an Lipidtröpfchen, die, unregelmäßig im Zytoplasma verteilt, fast in allen Luteinzellen beobachtet werden können. Diese Akkumulation von Fetttröpfchen ist für eine fettige Degeneration charakteristisch.

Die Rückbildung des Gelbkörpers bei ingraviden Hündinnen wurde ab dem 60. Tag p. o. beobachtet (DORE, 1989). Die Luteinzellen zeigen erste Regressionserscheinungen vor allem im Bereich des Kerns, was als Kernschrumpfung bezeichnet wird. Im Zytoplasma verteilen sich zahlreiche Lipidtröpfchen, die mit dem glatten ER einen Komplex bilden. Ab dem 120. Tag p. o. werden diese Veränderungen immer deutlicher. An den Luteinzellen treten vermehrt Lipideinlagerungen sowie Kernpyknose und Kernzerfall auf. Das glatte ER bildet eine Wirbelstruktur oft mit Lipidtröpfchen im Zentrum. Die zerfallenden Luteinzellen werden durch Fibroblasten und Kollagen auseinandergedrängt und ihre Reste durch Makrophagen beseitigt. Durch zunehmendes bindegewebiges Wachstum entsteht schließlich das narbenartige, kleine Corpus albicans.

2.4 Apoptose

2.4.1 Morphologie apoptotischer Zellen

Der kontrollierte Tod von Einzelzellen ohne Störung des Gewebeverbandes wird als programmierter, physiologischer Zelltod oder Apoptose bezeichnet. Der Begriff wurde von den Pathologen KERR, WYLLIE und CURRIE (1972) eingeführt. Bei der Apoptose handelt es sich um einen aktiven, energieabhängigen Prozess, der im Gewebe einzelne Zellen befällt und im Gegensatz zur Nekrose auf keinen entzündlichen Reaktionen beruht.

Morphologisch kann die Apoptose durch erste Veränderungen in den Mitochondrien und dann im Zellkern erkannt werden (Überblick bei ANGERMÜLLER et al., 1998, 1999). Im frühen Apoptosestadium verringert sich das Zellvolumen (Zellschrumpfung), im weiteren Verlauf kommt es zu einer Kondensierung des Zytoplasmas und zur Verdichtung seiner Organellen. Die Organellen werden kompakter, behalten jedoch mit Ausnahme des

ER ihre Struktur (TABIZADEH, 1995). Die Mitochondrien zeigen in dieser Phase eine Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran mit gleichzeitiger Ausstülpung der inneren Mitochondrienmembran. Die spätere Phase ist durch Veränderungen im Zellkern gekennzeichnet. Die Kerngröße verringert sich und es kommt zu einer Chromatinkondensierung an der Kernperipherie. Die letzte Phase der Apoptose ist durch die Fragmentierung der Zelle charakterisiert. Aus intakten Zellorganellen, Kernbruchstücken und Zytoplasma werden die sogenannten „apoptotic bodies“ gebildet (KERR et al., 1972). Anschließend werden die Reste von benachbarten Zellen oder Immunzellen phagozytiert (WYLLIE, 1992; HENGARTNER, 2000; Abb. 2).

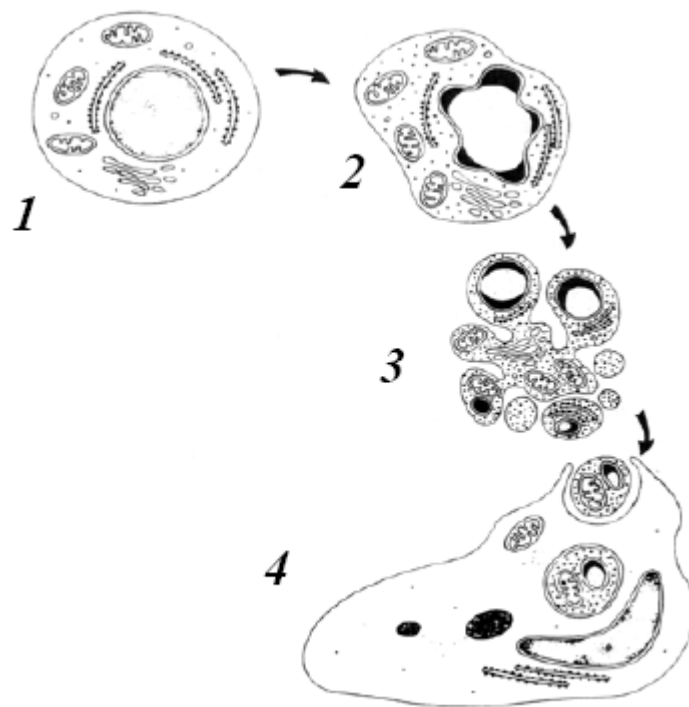


Abb. 2: Morphologische Veränderungen einer Zelle während der Apoptose. 1. Intakte Zelle, 2. Kondensation von Zytoplasma und Kernchromatin, 3. Bildung von „apoptotic bodies“, 4. Phagozytose (modifiziert nach Kerr et al. 1994)

2.4.2 Mechanismen der Apoptose

Erste Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen der Apoptose wurden durch Untersuchungen an dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* gewonnen. Im Laufe der Entwicklung eines Hermaphroditen werden 1090 Zellen gebildet, von denen 131 durch Apoptose sterben. Die an der Apoptose beteiligten Gene werden mit ced (*C. elegans* death gene) bezeichnet (ELLIS & HORVITZ, 1996). Ced-3 kodiert für eine Cysteinprotease, die dem *Interleukin-1 β converting Enzyme* (ICE) sehr ähnlich ist. Bei ced-4 handelt es sich um ein Protein, das als Transkriptionsfaktor dient (YUAN & HORVITZ, 1992) und ebenfalls in den Verlauf der Apoptose eingreift. Die Aktivität von ced-3 und ced-4 wird durch das Gen ced-9 reguliert. Eine Inaktivierung von ced-9 bewirkt die Expression sowohl von ced-3 als auch ced-4, wodurch das Apoptose-Programm aktiviert wird (HENGARTNER, 2000).

Bei Säugetieren sind 14 verschiedene Cysteinproteasen bekannt, die eine hohe Homologie zum ICE und zur ced-3 kodierten Protease aufweisen. Es handelt sich um Caspasen, die einen Cystein-Rest im aktiven Zentrum besitzen und ihre Substrate nach einer Asparaginsäure spalten (Cystein-Aspartasen). Die Caspasen bestehen aus drei Domänen, einer N-terminalen Prodomäne, einer großen p20-Domäne und einer kleinen p10-Domäne (Abb. 3). Sie werden als inaktive Vorstufen (Zymogene) synthetisiert. Nach der ersten Spaltung zwischen kleiner (p10, 10-12 kD) und großer Untereinheit (p20, 17-22 kD) und Abspaltung der Prodomäne wird ein Intermediat gebildet. Die aktiven Caspasen entstehen anschließend durch Tetramerisierung von je zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten (THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998) (Abb. 3).

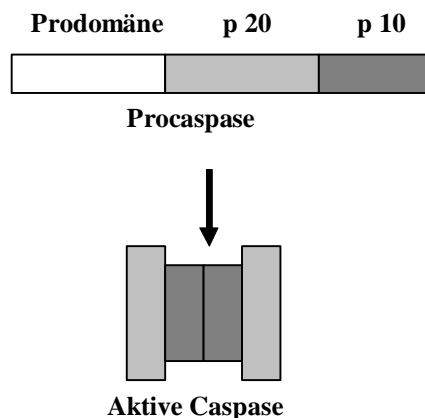


Abb. 3: Aktivierung der Caspasen durch proteolytische Spaltung und Tetramerisierung (THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998)

THORNBERRY & LAZEBNIK (1998) und STRASSER et al. (2000) teilten die Caspasen nach Funktion und Sequenzhomologien ein. Die Initiatorcaspasen 2, 8, 9 und 10 stehen am Anfang der Aktivierungskaskade und führen schließlich zur Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7. Die Caspasen 1, 4, 5, 11, 12, 13 und 14 sind nur an der Vermittlung von Entzündungsreaktionen beteiligt und wurden nicht bei der Apoptose nachgewiesen (EARNSHAW et al., 1999). Nachdem die Initiatorcaspasen aktiviert wurden, folgt eine proteolytische Kaskade, in der nacheinander weitere Caspasen aktiviert werden. Dabei gibt es Verzweigungen und Rückkopplungen, so dass ein komplexes Netzwerk entsteht (COHEN, 1997).

Zur Caspaseaktivierung führen zwei unterschiedliche Wege: einmal durch eine Aktivierung des Todesrezeptors, und andermal durch Freisetzung eines mitochondrialen proapoptischen Proteins ins Zytoplasma (HENGARTNER, 2000). Der Todesrezeptor CD 95 (APO-1/Fas), lokalisiert auf der Zellmembran, gehört zur Familie der Tumor Necrosis Factor-Rezeptoren (TNF) und kann nach Aktivierung der Death Domain (DD)

cytotoxische Signale ins Zytoplasma übertragen (SCAFFIDI et al., 1999). Eine Trimerisierung von CD 95 Rezeptoren führt zur Komplexbildung der DD Domäne, die im Verlauf des Prozesses mit einem anderen Molekül, dem Fas Associated Death Domain (FADD) bindet. FADD ist mit einer Todeseffektordomäne, der Death Effector Domain (DED), ausgestattet (CHINNALYAN et al., 1995). Über seine Death Effector Domain (DED) bindet Fas Associated Death Domain (FADD) die Cysteinprotease (Caspase-8, Caspase-10) an den Rezeptor. Dadurch kommt es zur Bildung des Komplexes „Death Inducing Signaling Complex“ (DISC) (KISCHKEL et al., 2001), der aus trimerisiertem CD 95, FADD und Caspase-8 oder Caspase-10 besteht. Die Caspasen werden proteolytisch aktiviert und initiieren die proteolytische Caspase-Kaskade; sie werden daher als Initiatorcaspasen bezeichnet.

Ein weiterer Apoptose-Signalkaskadeweg verläuft über die Mitochondrien. Durch Apoptosesignale induzierende Vorgänge, wie DNA-Schädigung, Nährstoffmangel, oxidativen Stress (KAUFMANN & EARNSHAW, 2000) kommt es nach Abfall des mitochondrialen Transmembranpotentials (KROEMER et al., 1998) zur Freisetzung von Cytochrom c, Apoptotic Protease-Activating Factor-1 (Apaf-1), Apoptosis Inducing Factor (AIF) und Endonuklease G ins Cytoplasma. Cytochrom c bindet zuerst an die Caspase Recruiting Domäne (CARD) von Apaf-1 und dann, unter Verbrauch von ATP, mit der CARD von Caspase-9 (ADAMS & CORY, 2002). Die Procaspase-9 wird proteolytisch aktiviert und dadurch die Caspase-9 freigesetzt, was zur Auslösung der Caspase-Kaskade führt. Die Caspasen 3, 6 und 7 bilden die Gruppe der sogenannten Effektorcaspasen und sind für die proteolytische Spaltung weiterer Proteine zuständig. Caspase-3 spaltet die DNA-abhängige Proteinkinase und den Inhibitor der Caspase Aktivator DNase (CAD). Es kommt dadurch zur Aktivierung von CAD und schließlich zur DNA-Fragmentierung (THORNBERRY et al., 1997; SAKAHIRA et al., 1998; SAMEJIMA et al., 1998). Andere

proapoptotische Proteine, AIF und Endonuklease G, werden nach Apoptoseinduktion in den Zellkern translozieren und induzieren dort eine internukleosomale DNA-Fragmentierung und DNA-Kondensation ohne Beteiligung von aktivierten Caspasen (THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998). Es entstehen Mono- und Oligonukleosomen, die nach elektrophoretischer Auftrennung die typische DNA-Leiter-Struktur zeigen. Die Zerlegung der Kern-DNA in Doppelstrang-Fragmente ist apoptosespezifisch und geht mit den charakteristischen Veränderungen in der Kernmorphologie einher (WYLLIE et al., 1980; ARENDS et al., 1990; WYLLIE, 1992, 1993).

Die Aktivierung der Caspasen unterliegt einem komplexen Regulationsmechanismus. Dazu gehören der „Inhibitor of Apoptosis Protein- (IAPs)“ und Mitglieder der „Bcl-2-Proteinfamilien“. IAPs sind eine Familie von antiapoptotischen Proteinen, die mit den aktiven Caspasen-3, 7, oder 9 interagieren und deren enzymatische Aktivität inhibieren können (KAUFMANN & HENGARTNER, 2001). Hohe Konzentrationen von IAPs können die Caspase-9 Aktivierung durch das Cytochrom c neutralisieren.

Die Bcl-2-Familie besteht aus anti-apoptotischen (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-w) und aus proapoptotischen Proteinen (Bax, Bad, Bak, Bid) (KROEMER et al., 1998). Die Aufgabe der Bcl-2-Familie liegt in der Kontrolle der Freisetzung von Proteinen aus dem mitochondrialen Intermembranraum. Die Mitglieder der Bcl-2-Familien sind durch den Besitz von bis zu 4 verschiedenen Domänen gekennzeichnet und können durch eine Bildung von Homo- und Heterodimeren miteinander interagieren und entweder pro- oder anti-apoptotisch wirken (STRASSER et al., 2000).

Es wird postuliert, dass das Verhältnis von pro- und anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie letztendlich dafür verantwortlich ist, ob die Zelle für einen apoptotischen Stimulus empfänglich ist oder nicht (ADAMS & CORY, 2002).

2.4.3 Vorkommen der Apoptose im CL

Der programmierte Zelltod spielt im Bereich der Reproduktionsorgane eine wichtige Rolle. Apoptose wurde als physiologischer Prozess bei der zyklischen Regression des CL bei Hund (AIUDI et al., 2004, 2006), Schaf (SAWYER et al., 1990), Rind (JUENGEL et al., 1993; ZHENG et al., 1994), Hase (DHARMARAJAN et al., 1994), Hamster (McCORMACK et al., 1998), Ratte (BRUCE et al., 2001; MATSUYAMA et al., 1996) und bei der Stute (AL-ZIÁBI et al., 2002) nachgewiesen. Im Gelbkörper ingravidier Hündinnen haben AIUDI et al. (2004, 2006) mittels DNA-laddering und Gelelektrophorese bereits in der frühen CL-Phase (Tag 15-30. p. o.) erste Anzeichen apoptotischer Veränderungen festgestellt, deren Anzahl im Verlauf der Lutealphase anstieg.

Die Befunde beim Rind (JUENGEL et al., 1993; ZHENG et al., 1994) sprechen eher für eine strukturelle als funktionelle Bedeutung des programmierten Zelltodes bei der Gelbkörperregression, da die Apoptose der Luteinzellen erst nach Beginn des Progesteronabfalls nachweisbar war. SAWYER et al. (1990) stellten bei Schafen nach Verabreichung von PGF2 α eine ungleichmäßige Degeneration der Luteinzellen fest; so erschienen einige Zellen morphologisch intakt, während sich andere bereits im fortgeschrittenen Stadium der Apoptose befanden. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung beim Primaten (FRASER et al., 1999) haben erhebliche Unterschiede zwischen natürlicher und durch Prostaglandine induzierter Luteolyse erkennen lassen. Im Verlauf der natürlichen Regression kam es zu einer Atrophie der Luteinzellen, Kondensation zytoplasmatischer Einschlüsse und Organellen sowie Akkumulation von Lipiden. Bei PGF2 α induzierter Luteolyse zeigten die Luteinzellen geschrumpfte Kerne und zahlreiche Vesikel und Vakuolen. Im bovinen CL wurden dagegen keine Unterschiede im Apoptosebild bei spontaner und durch PGF2 α induzierter Luteolyse festgestellt (JUENGEL et al., 1993). Eine apoptotische DNA-Fragmentierung konnte auch bei Ratten

(WANG et al., 2003) durch eine Applikation von $\text{PGF}_2\alpha$ ausgelöst werden. TELLERIA et al. (2001) beobachteten nach Verabreichung eines Antigestagens (RU 486) bei Ratten in der späten Trächtigkeitsphase mit dem TUNEL-Verfahren eine gesteigerte Anzahl von apoptotischen Zellen. Sie zeigten Degenerationserscheinungen wie zytoplasmatische Desorganisation, prominente Nucleoli und Kondensation des Kernchromatins. Nach Zugabe des Antigestagens RU 486 konnte auch bei kultivierten bovinen Lutealzellen (RUEDA et al., 2000) innerhalb von 48 Stunden eine Zunahme apoptotischer DNA-Fragmente um 40 % festgestellt werden.

2.5 Luteale Steroide als auto-/parakrine Regelfaktoren

In zahlreichen Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass im CL produzierte Steroide als auto-/parakrine Faktoren an der Regulation der CL Funktion beteiligt sind. In der Primärzellkultur von Granulosa- und Thekazellen führt die Zugabe von Progesteron bei der Ratte (RUIZ de GALARRETA et al., 1985), beim Schwein (TONETTA, 1987; RODWAY et al., 1999) und Schaf (CAFFREY et al., 1979) zu einer Steigerung der Aktivität der 3β -HSD und des P450 side chaine cleavage enzyme (P450 scc). In der bovinen Luteinzellkultur (PATE, 1996) und in der Zellkultur von porcinen Granulosazellen (RODWAY et al., 1999) zeigte sich nach Zugabe synthetischer Gestagene eine erhöhte Progesteronkonzentration. Dagegen bewirkte die Behandlung von bovinen Luteinzellen aus der frühen CL-Phase mit einem Progesteronantagonisten (Onapristone) eine Reduktion der Progesteron-Sekretion in vitro (SKARZYNSKI & OKUDA, 1999).

Beim Mensch stimuliert Progesteron in der Zellkultur die Differenzierung der Granulosa- und Thekazellen zu Luteinzellen, inhibiert jedoch die Granulosazellproliferation (CHAFFKIN et al., 1993). Die Anwendung von Progesteronrezeptor-Antagonisten hat einen hemmenden Effekt auf die Luteinisierung von

bovinen Granulosazellen (LIOUTAS et al., 1997). Beim Rind ist Progesteron in der Lage, die LH-Rezeptorsynthese in den Luteinzellen zu stimulieren (JONES et al., 1992).

Zahlreiche Befunde lassen auf die Bildung von Estradiol-17 β in den Luteinzellen schließen [Hund (NISHIYAMA et al., 1999), Mensch (JOHNSON et al., 1996), Schwein (GREGORASZCZUK, 1983; EINSPIANIER et al., 1991), Rind (OKUDA et al., 2001) Ratte (ELBAUM & KEYES, 1976)]. Die Bedeutung von lutealem Estradiol-17 β hängt offensichtlich von der Spezies, vom Zyklusstand und der spezifischen Hormonkonzentration ab. Beim Rind (LIEBERMANN & SCHAMS, 1994) stimuliert Estradiol-17 β in der frühen Lutealphase die Sekretion von Oxytozin. In der mittleren und späten Phase des Diöstrus bewirkt es dagegen eine Reduktion der lutealen Oxytozinproduktion. OKUDA et al. (2001) stellten fest, dass Estradiol-17 β im bovinen CL eine stimulierende Wirkung auf die PGF2 α -Sekretion hat. Es wurden aber keine Effekte auf die Progesteron- und Oxytozinproduktion beobachtet.

Beim Schaf führte ein Mangel an Estradiol-17 β in der präovulatorischen Phase zu einer Insuffizienz der Granulosaluteinzellen (LUND et al., 1999). Eine Behandlung beim Schaf mit Estradiol-17 β über 20 Tage, beginnend vier Tage p. o., verursachte eine Verlängerung des Interöstrus-Intervalls durch eine Verlängerung der CL-Lebensspanne (HAZZARD & STORMSHAK, 1997). Untersuchungen beim Schwein zeigten, dass PGF2 α in der frühen und mittleren Lutealphase die Estradiol-17 β Produktion stimuliert; gleichzeitig wurde der die Progesteronproduktion stimulierende Effekt von Estradiol-17 β gezeigt; daraus wurde geschlossen, dass der luteotrope Effekt von PGF2 α durch Estradiol-17 β vermittelt wird (WUTTKE et al., 1998). Beim Kaninchen zeigte Estradiol-17 β in der Luteinzellkultur eine stimulierende Wirkung auf die Progesteronsynthese, die auf eine Potenzierung des luteotropen Effekts von IGF-I zurück zu führen ist (CHEN et al., 1997). Beim Menschen konnten ENDO et al. (1998) eine Estradiol-17 β -konzentrationsabhängige

Progesteronproduktion zeigen, wobei eine niedrige (5 ng/ml) Konzentration in der Lage war die Progesteronproduktion zu stimulieren, während eine hohe Konzentration (100 ng/ml) eine hemmende Wirkung hatte.

3 Material und Methoden

3.1 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

3.1.1 Versuchsaufbau

Bei 19 Beagle-Hündinnen wurden zu definierten Zeitpunkten post ovulationem (p. o.) (Tage 5, 15, 30, 45, 60, 75 und 113) die Ovarien mittels Ovariohysterektomie (OHE) entnommen. Die CL wurden aus den Ovarien separiert und anschließend in Epon eingebettet. Die Darstellung der morphologischen Veränderungen erfolgte mittels Transmissionselektronenmikroskopie.

3.1.2 Probenaufbereitung

Nach der Entnahme der CL wurden diese in 2-3 mm dicke Scheiben geschnitten und in Yellow-Fix (Formaldehyd-Glutaraldehyd-Trinitron-Fixation) eingelegt. Das Yellow-Fix wurde im Verlauf der nächsten Tagen gewechselt, und das Gewebe 4-6 h in der Fixationslösung gelassen.

Danach wurden die Proben aus dem Yellow-Fix entnommen und mehrmals in Phosphatpuffer gespült. Anschließend wurden sie für 1-3 h in 1 % Osmiumsäure nachfixiert. Dann wurden die Proben erneut dreimal in Phosphatpuffer für jeweils 10 min gespült und entwässert. Die Entwässerung erfolgte in der aufsteigenden Alkoholreihe, indem zu den Proben zunächst nacheinander für jeweils 15 Minuten, 50- iger, 70- iger, 80- iger, 90 % iger und absoluter Alkohol gegeben wurde. Die weitere Entwässerung erfolgte dreimal für je 40 min mit absolutem Alkohol und danach dreimal für je 10 min mit Xylol.

Danach wurden die Proben über Nacht in ein Gemisch aus Xylol und Epon (1:1) mit 2 % DMP-30 verbracht. Am folgenden Tag wurden die Proben in reines Einbettmedium (Epon mit 2 % DMP-30) für mindestens 6 h überführt und dann 12 h im Wärmeschrank bei 60 ° C polymerisiert.

Von den in Epon eingebetteten Proben wurden 0,5 bis 1 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt, die mit einer Richardson-Lösung angefärbt wurden und als Orientierung für die elektronenmikroskopische Untersuchung dienten.

Die angefertigten Ultradünnschnitte (60-90 nm) wurden auf mit Collodionfolie bezogene Kupfernetze aufgezogen und mit 10 % alkoholischem Uranylacetat über 30 min bei 40 °C, danach mit 1 % Bleicitrat 1 min und 20 sec bei 20 °C kontrastiert. Dabei reagiert Uranylacetat mit Nukleinsäuren und Proteinen, Bleicitrat dagegen sorgt für eine Kontrastierung von Membranen, Proteinen, Nukleinsäuren und Glykogen (ROBINSON et al., 1985). Zur Durchführung wurde der LKB 2168 Ultrastainer der Firma Reichert® mit den Gebrauchslösungen Ultrastain 1 und 2 von Leica® verwendet. Im Anschluss erfolgte die Beurteilung am Elektronenmikroskop EM 109 von Zeiss® unter Verwendung der normalen und reduzierten 70 mm-Farbpatrone.

3.1.3 Fotografie

Zur Fotografie am Elektronenmikroskop (s.o.) dienten KODAK® EM Planfilme, die mit KODAK® D19 entwickelt wurden. Für die Bildabzüge wurde das AGFA® Brovira-Speed BN 310 RC und Brovira-Speed BH-Papier verwendet und die Abzüge im AGFA® Neutol Liquid NE Entwickler (1:9) entwickelt. Die Erstellung der Fotoabzüge wurde mit einer 2,3-fachen Vergrößerung am Vergrößerungsgerät LogE D-54 (LogEtec AG®) durchgeführt.

3.2 Immunhistochemischer (IHC) Nachweis der Apoptose

3.2.1 Versuchsaufbau

Bei 20 Hündinnen unterschiedlicher Rassen wurden zu definierten Zeitpunkten p. o. (Tage 5, 15, 25, 35, 45 und zwischen Tagen 60-80) die Ovarien mittels OHE entnommen, die CL separiert und anschließend in Paraffin eingebettet.

Die Darstellung apoptotischer Zellen erfolgte über etablierte immunhistochemische Verfahren (HOFFMANN & BÜTTNER, 1998; SCHULER et al., 1999).

3.2.2 Fixierung und Einbettung der Proben

Die gewonnenen CL wurden von übrigem Ovargewebe separiert, mit 0,9 % NaCl gespült und in Formol nach Lillie (1951) für 20-24 h fixiert. Dann verblieben sie im 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,2) bis zur Einbettung in Paraffin.

3.2.3 Vorbereitung für die IHC

Es wurden zirka 3 µm dicke Schnitte angefertigt und auf APES (Aminopropyltriethoxysilan) beschichtete Objektträger gezogen. Die Entparaffinierung der Gewebsschnitte erfolgte für 2x15 min in Xylol, anschließend wurden die Schnitte zunächst 2x10 min in reinem Ethanol und danach jeweils 5 min in 96 %, 80 %, 70 % und 50 % Ethanol rehydriert. Dann erfolgte eine 5 min Spülung mit Aqua dest.

Zur Demaskierung der durch Formalinfixierung veränderten Epitope wurde zunächst eine Vorbehandlung in der Mikrowelle mit Citratpuffer durchgeführt. Die Schnitte wurden dazu zuerst 5 min bei Raumtemperatur belassen und dann 3x5 min in der Mikrowelle bei 560 Watt gekocht. Zwischendurch wurde der durch Verdunstung verlorene Anteil des Puffers durch Aqua dest ersetzt. Nach Beendigung dieser Behandlung wurden die Schnitte bei Raumtemperatur 20 min im sich abkühlendem Citratpuffer belassen und anschließend 2x2 min in Aqua dest und danach 1x5 min in PBS-Puffer (pH 7,2) gewaschen.

Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase erfolgte für 5 min eine Überschichtung mit 2,0 % Wasserstoffperoxid in PBS-Puffer. Danach wurde wieder 3x5 min in PBS-Puffer gespült. Die Objektträger wurden aus dem Puffer entnommen, mit der Präparatseite nach oben in eine feuchte Kammer gelegt und überschüssige Flüssigkeit, die sich um die Schnitte herum befand, mit Hilfe einer Pumpe abgesaugt. Zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen erfolgte die Überschichtung der Schnitte mit 10 % inaktiviertem Ziegen Serum in PBS-Puffer und eine 30 min Inkubation bei Raumtemperatur.

3.2.4 Darstellung der Apoptose mittels anti-aktiver Caspase-3 Antikörper

Die immunhistochemische Darstellung der Apoptose erfolgte mittels einer indirekten Immunperoxidase-Färbung unter Verwendung der Avidin-Biotin-Technik zur Signal-Verstärkung (STERNBERGER, 1967).

Nach Absaugen der überschüssigen Blockierlösung wurden die Schnitte mit der Verdünnung des antigenspezifischen Primärantikörpers (1:50) überschichtet und für 20 h in der feuchten Kammer bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Als Primärantikörper wurde ein monoklonaler anti-aktive Caspase-3 Antikörper mit der Klonbezeichnung C92-605 verwendet. Die Antikörperlösung wurde nach Ablauf der Inkubationszeit abgesaugt, die Objektträger für 3x5 min in PBS-Puffer gewaschen, flach in die feuchte Kammer gelegt und überschüssige Flüssigkeit um die Gewebeschnitte entfernt. Es folgte nun die Überschichtung der Schnitte mit dem biotinylierten Sekundärantikörper, einem Ziegenantikörper gegen Maus-IgG-Immunglobuline, in einer Verdünnung von 1:200 in PBS-Puffer für 30 min bei Raumtemperatur.

Dann erfolgte die Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten Avidin-Biotin-Komplex, der in einer Verdünnung von 1:100 in PBS-Puffer mindestens 30 min vor Gebrauch angesetzt wurde. Die Inkubation betrug 30 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer. Der Überstand wurde abgesaugt und die Schnitte 3x5 min in PBS-

Puffer gespült. Anschließend wurden die Präparate für 2 min in den unmittelbar zuvor frisch angesetzten, gefilterten und 30 % H_2O_2 enthaltendem Imidazol-Puffer-3-3'-Diaminobenzindin-Lösung (DAB) eingebracht. Die Präparate wurden danach 2x10 min in Aqua dest gewaschen und dann in Hämatoxylin nach Harris, 2:1 mit Wasser verdünnt, getaucht, um eine schwache Gegenfärbung zu erhalten. Nach dem 15 min "Bläuen" unter fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte mit KAISERS Glyceringelatine eingedeckelt.

Als positive Kontrolle diente identisch behandeltes Gewebe von caninen Lymphknoten, bei welchem der Anteil apoptotischer Zellen sehr hoch ist. Als negative Kontrollen befand sich auf jedem Objektträger ein zusätzlicher Schnitt, auf den statt der Primärantikörper-Verdünnungslösung allein PBS-Puffer in entsprechender Menge gegeben wurde.

3.2.5 Darstellung der Apoptose mittels TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)

Die TUNEL-Methode beruht auf der Verlängerung von freien DNA-Enden in den Kernen von Zellen durch das Enzym Terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT). In die Verlängerungen werden modifizierte Nukleotide, wie zum Beispiel biotinyliertes Desoxyuridin (dUTP) eingebaut. Der Nachweis der modifizierten Nukleotide zeigt somit die Anwesenheit fragmentierter DNA an.

Der Nachweis apoptotischer Zellen erfolgte mittels TUNEL-Assay, unter Verwendung des ApopTag[®] Peroxidase Kits.

Die zirka 3 mm dicken Schnitte wurden entparaffiniert und rehydriert, dann 5 min in PBS-Puffer gewaschen (s.o.). Danach erfolgte die Inkubation in Proteinase (20 µg/ml) in PBS-Puffer für 15 min bei Raumtemperatur. Nach einer 2x2 min Waschung in Aqua dest folgte die Blockierung der endogenen Peroxidase für 5 min mit 3 % H_2O_2 -Lösung. Dann

wurden die Schnitte 3x5 min in Aqua dest gewaschen und anschließend in eine feuchte Kammer gelegt. Sie wurden danach mit Equilibrierungspuffer bedeckt, welcher nach etwa 1 min wieder entfernt wurde. Nun folgte die Enzymreaktion durch Zugabe der TdT-Enzymlösung (3 Teile Enzym und 7 Teile Reaktionspuffer). Nach einstündiger Inkubation in einer feuchten Kammer bei 37 °C wurde diese Reaktion durch 10 min Einwirken des Stop/Wasch-Puffers (1:35 verdünnt in H₂O) beendet. Nun wurde 3x1 min in PBS-Puffer gewaschen, das Anti-Digoxigenin-Peroxidase-Konjugat auf die Schnitte gegeben und für 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde 4x2 min in PBS-Puffer gewaschen und anschließend folgte eine 6 min Inkubation in der frisch angesetzten und filtrierten DAB-Substratlösung. Die Präparate wurden 3x5 min in Aqua dest gewaschen und mit Hämatoxylin leicht gegengefärbt. Nach 10 min „Bläuen“ unter fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte mit KAISERS Glyceringelatine eingedeckelt. Als positive Kontrolle diente identisch behandeltes Gewebe von caninen Lymphknoten. Als Negativkontrolle wurde ein zusätzlicher Schnitt mitgeführt, bei dem statt der TdT-Enzymlösung ein PBS-Puffer aufgetragen wurde.

3.2.6 Auswertung der gefärbten Gewebeschnitte

Die Auswertung der Präparate erfolgte am Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung. Von jedem untersuchten CL kamen jeweils drei von sechs verschiedenen Paraffinblöcken stammende Schnitte zur Auswertung. Die Schnitte wurden mit negativen beziehungsweise positiven Kontrollen verglichen, um unspezifische und positive Färbereaktionen zu differenzieren.

Als apoptotische Zellen wurden nicht nur positive, braun gefärbte Zellen sondern auch die Zellreste und Zelltrümmer definiert. Diffuse, braune Färbungen, die nicht Zellen beziehungsweise Zellresten und Zelltrümmern zugeordnet werden konnten, wurden nicht gewertet.

3.3 Primärkulturen mit Luteinzellen

Die Funktionalität der in Primärkulturen eingebrachten Luteinzellen sollte an Hand der Progesteronsynthese dargestellt werden. Dazu durchgeführte Vorversuche hatten jedoch gezeigt, dass im positiven Bereich liegende und eine gewisse „Dynamik“ reflektierende Werte sich nur mit Zellen aus CL ergaben, die am 5. bzw. 10. Tag p. o. gewonnen worden waren. In vorliegender Arbeit wurden daher für alle in vitro Untersuchungen anschließend CL verwendet, die am 5. Tag p. o. gewonnen worden waren.

3.3.1 Organpräparation und Isolierung der Zellen

Die Ovarien wurden mittels OHE von 9 Hündinnen der Rasse Beagle am Tag 5 p. o. gewonnen und für den Transport ins Labor in angewärmtem PBS-Puffer (37 °C) aufbewahrt. Die folgende Gewinnung der Luteinzellen aus dem CL orientierte sich an dem von GIESE (1999) für die Präparation von bovinen Luteinzellen beschriebenen Verfahren und erfolgte unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar flow Sterilbank.

Durch sorgfältiges Reinigen der Arbeitsflächen und Werkzeuge mit 70 % Ethanol wurde einer eventuellen Kontamination durch Bakterien und Pilze vorgebeugt. Nur sterilisierte beziehungsweise autoklavierte Glaswaren, Pipettenspitzen und Lösungen wurden verwendet.

Die CL wurden aus den Ovarien freipräpariert, ihre bindegewebige Kapsel entfernt und in etwa 2 mm³ große Stücke geschnitten und mehrfach mit PBS-Puffer gespült. Dann erfolgte die Inkubation der Gewebewürfel mit 20 ml proteolytischer Collagenase (Typ 2, 284 U/mg) über 3-4 h bei 37 °C im Wärmeschüttelbad. Nach enzymatischem Verdau wurde das Gewebe unter Zugabe von 50-100 ml Kulturmedium (Medium DMEM/HamsF12) mehrfach durch einen 70 µm Gazefilter zur Abtrennung bindegewebiger Anteile und Zellaggregate schonend passiert. Das Filtrat wurde in einem Becherglas aufgefangen und nach Zugabe von Kulturmedium auf 2-6 Zentrifugenröhrchen

verteilt. Nach einer Zentrifugation bei 27,7 g über 5 min wurde der Überstand verworfen, die dissoziierten Zellen und Zellaggregate wurden in 5-10 ml Kulturmedium resuspendiert und erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die Prozedur von Passieren und Suspendieren wurde 3-mal wiederholt. Danach erfolgte eine Abschätzung der Qualität der erhaltenen Zellen unter dem Mikroskop (s. Kap. 3.3.2).

3.3.2 Zellzahl und Vitalitäts-Bestimmung

Zur Ermittlung der Zellzahl wurden 27 µl der Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau, einem Vitalfarbstoff, der nur von toten Zellen aufgenommen wird, vermischt und die erforderliche Menge auf die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop wurde die Anzahl der ungefärbten lebenden und der gefärbten toten Luteinzellen im Leukozytenzählfeld, das in 16 Quadrate unterteilt ist, ausgezählt, wobei das Volumen über einem Quadrat 0,1 µl entspricht. Nach Bildung des Mittelwertes der Zellzählung aus 4 Quadraten multipliziert mit dem Faktor 10000, konnte die Zellzahl pro Milliliter angegeben werden.

Die Dichte (D) der vitalen Zellen wurde mit folgender Formel berechnet:

$$D = n \times VF \times 10^4 \div 4$$

n = Zahl lebender Zellen aus 4 Feldern

VF = Verdünnungsfaktor ($47/27 = 1,74$)

10^4 = Hochrechnung von 0,1 µl auf 1,0 ml

4 = erfasste Felderzahl

Anschließend wurde die Zellsuspension in Collagen-beschichtete Kulturflächen aliquotiert.

3.3.3 Inkulturnahme isolierter Zellen

Die Zellkulturen wurden bei 37°C, 5 % CO₂-Gehalt und mindestens 90 % relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank gezüchtet. Für die Kultivierung wurden Multiwellplatten

(12-Well) mit je 2,5 ml Kulturmedium pro Well eingesetzt. Für eine bessere Adhäsion der Zellen wurden die Kulturflächen teilweise mit Collagen beschichtet. Die Collagenlösung (Collagen Typ I 4,53 g/l) wurde 1:4 mit Aqua dest verdünnt und auf die Kulturflächen aufgetragen. Nach dem Protokoll von GIESE (1999) wurden die Kulturflächen 1 h bei 4-6 °C inkubiert. Dann wurde die Collagenlösung abgezogen, die Gefäße zweimal mit PBS Puffer gewaschen und bei 37 °C getrocknet.

Die Luteinzellen wurden in einer Konzentration von zirka 15×10^4 lebenden Zellen pro Well ausgesät.

Nach den ersten 24 und 48 h der Inkubation erfolgte eine Beurteilung der Zellkultur am Invert-Mikroskop und Bewertung von Adhäsion, Konfluenz, Größe und Form der Einzelzellen.

3.3.3.1 Verwendetes Kulturmedium

Als Kulturmedium diente eine Mischung aus Ham's F 12 und der Dulbecco-Modifikation von Eagles MEM (PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich).

Aufgrund der an anderer Stelle mit Luteinzellen gemachten Erfahrungen (GREGORASZCZUK, 1985; CAROLL et al., 1992; GIESE, 1999), wurden zu 100 ml Grundmedium (DMEM / Ham's F 12) folgende Zusätze gegeben:

● L-Glutamin	1,1 ml (34 µg/ml)
● Insulin Transferrin	1,0 ml (22 µg/ml)
● Fetales Kälberserum (FKS)	5,0 ml (5 %)
● HCG	400 µl (9,1 U/ml)
● Prolactin (Schaf)	250 µl (5,7 U/ml)
● Penicillin-Streptomycin	1,0 ml (91 U/ml+91 µg/ml)
● Amphotericin B Solution	1,0 ml (2,28 µg/ml)

Der Prolaktinzusatz ergab sich aus der Überlegung, dass Prolaktin beim Hund ein luteotrop wirkender Faktor ist (OKKENS & BEVERS, 1990; ONCLIN & VERSTEGEN, 1997a).

3.3.3.2 Medienwechsel

Die Häufigkeit des Medienwechsels hängt von der Entwicklung der Zelldichte und der Zellaktivität ab. Für gutes Wachstum benötigen die Luteinzellen regelmäßig frisches Medium. Der zu dem Grundmedium zugegebene Farbindikator Phenolrot zeigt bereits geringe Verschiebungen des pH-Wertes durch einen Farbumschlag an. Bei hohem CO₂-Gehalt durch hohe Stoffwechselaktivität der Zellen tritt ein Umschlag ins Gelbe auf (Abnahme des pH-Wertes), was die Notwendigkeit eines Medienwechsels anzeigt. Vor dem Medienwechsel wurde das Kulturmedium bei 37 °C im Wasserbad erwärmt. Das alte Medium wurde abgesaugt und die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS-Puffer mit neuem Medium versorgt.

- Erster Medienwechsel: nach 48 h
- Zweiter Medienwechsel: nach 72 h

3.3.4. Bestimmung der Progesteron-Konzentration im Medium

Die Bestimmung von Progesteron erfolgte nach dem bei HOFFMANN et al. (1973) beschriebenen und im Labor etablierten Radioimmunoassay (RIA). Die Proben wurden im Doppelansatz extrahiert. Je nach Dauer der Inkubation (48 h, 72 h, 96 h) wurden die Proben entsprechend 1:100 (48 h) und 1:10 (72 h und 96 h) mit PBS-Puffer verdünnt. Als Kontrollprobe diente Kulturmedium (s. Kapitel 3.5.3.1). Der Hormonwert der Kontrollproben lag für Progesteron bei <0,1 ng/ml.

3.3.5 Versuchsansätze nach Zusatz von Mifepriston (RU-38486) und 4-Hydroxytamoxifen

In diesen Untersuchungen sollte auf eine mögliche Bedeutung von lutealem Progesteron und Estradiol-17 β auf die CL-Funktion als parakrine Regelfaktoren durch die kompetitive Hemmung der lutealen Progesteron- und Östrogen-Rezeptoren geschlossen werden (HOFFMANN et al., 2004a). Als Progesteronantagonist kann dabei Mifepriston (RU-38486) (NOHR et al., 1993; BLENDINGER et al., 1997), als Östrogenantagonist Tamoxifen (EYSTER & CLARK, 1989; PITZEL et al., 1990) zur Anwendung. Um sicher zu stellen, dass ausreichend Substrat für die Steroidogenese vorhanden ist, wurde einigen Inkubationsansätzen auch Cholesterin zugesetzt. Im Hinblick auf die in Kontrollansätzen nach 48 h Inkubationszeit gemessenen Progesteronkonzentration, erfolgten die Zusätze der Hormonantagonisten im μ -molaren Bereich:

Zusatz	Endkonzentration im Inkubationsansatz	
Mifepriston	2,5 μ mol/L	11,06 μ g/ml
Tamoxifen	10,3 μ mol/L	4 μ g/ml
Cholesterin	0,005 mmol/L	2 ng/ml
Kontrolle (kein Zusatz)		

Die Ansätze erfolgten in Doppel-Ansätzen, wobei jeweils eine Kontrolle mitlief.

Die Zugabe der Zusätze erfolgte mit dem Medienwechsel nach 72 h. Die damit verbundene „Vorinkubation“ von 72 h sollte die Bildung eines Zellrasens sicherstellen.

Nach weiteren 24 Stunden, d. h. nach 96 h Gesamt-Inkubationszeit, wurde der Überstand entfernt und die Inkubation abgebrochen. Die nach 48, 72, und 96 h abgenommenen Medien wurden bis zur Bestimmung der Progesteronkonzentration bei -20 °C aufbewahrt.

3.4 Materialien und Geräte

Soweit nicht anders angegeben, stammten alle Reagenzien von der Firma Merck, Darmstadt und waren p.A. Qualität. Aqua dest stammte aus einer Millipore-Filteranlage.

3.4.1 Verwendete Antikörper

- Anti-active Caspase-3 Antikörper, Firma BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Ziege biotiniliertes anti-maus Ig G, Firma Vector Laboratories, Burlingame, USA

3.4.2 Verwendete Medien, Puffer und Lösungen

- DMEM/Ham's F-12 Medium (1:1) (PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich)

- PBS-Puffer für die Zellkultur (pH 7,4):

Natriumchlorid (NaCl)	9,00 g
Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,795 g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	0,144 g
Aqua dest	ad 1000,00 ml

- PBS-Puffer für die Immunhistologie, Stammlösung (pH 7,4):

Natriumchlorid (NaCl reinst)	41,00 g
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	11,00 g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	2,75 g
Aqua dest	ad 1000,00 ml

Für die Gebrauchslösung (pH 7,2) wurden 200 ml der Stammlösung mit Aqua dest auf 1000 ml aufgefüllt.

•0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,2):

Lösung A:

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	13,80 g
Aqua dest	ad 1000,00 ml

Lösung B:

Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	17,80 g
Aqua dest	ad 1000,00 ml

Für 100 ml Natriumphosphatpuffer werden 28,3 ml Lösung A mit 71,7 ml Lösung B gemischt.

•0,1 M Imidazol-HCl-Lösung (pH 7,08):

Imidazol (Fluka, Neu-Ulm)	8,51 g
1 N HCl	60,00 ml
Aqua dest	ad 2000,00 ml

•10 mM Citratpuffer (pH 6,0):

Lösung A:

Citronensäure-Monohydrat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	21,01 g
Aqua dest	ad 1000,00 ml

Lösung B:

Trinatriumcitrat-Dihydrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	29,41 g
Aqua dest	ad 1000,00 ml

9 ml Lösung A und 41 ml Lösung B mit 450 ml Aqua dest mischen.

•DAB (Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid)-Substratlösung:

0,1 M Imidazol-HCl (Fluka, Neu-Ulm) 200,00 ml

Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (Fluka, Neu-Ulm) 0,10 g

Die Lösung direkt frisch ansetzen und filtern.

H₂O₂ 30 % 70,00 µl

•Formaldehyd 4 %, gepuffert (pH 7,0):

40 % Formol 500,00 ml

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH₂PO₄·H₂O) 20,00 g

Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄) 32,50 g

Aqua dest ad 5000,00 ml

•Wasserstoffperoxid-Lösung 0,3 %:

30 % H₂O₂ 2,00 ml

Aqua dest ad 200,00 ml

•Wasserstoffperoxid-Lösung 2,0 %:

30 % H₂O₂ 13,33 ml

Aqua dest ad 200,00 ml

3.4.3 Sonstige Reagenzien und Materialien

•Amphotericin B (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

•ApopTag[®] Peroxidase Kits (Chemicon, Großbritannien)

•Biotin-16-2`-Desoxyuridin-5`-Triphosphat (50 nmol/50 µl) (Boehringer Ingelheim GmbH)

- Collagenase Typ II (Biochrom KG, Berlin)
- Collagen Typ I (BD Biosciences)
- Fetales Kälberserum (PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich)
- Humanes Choriongonadotropin, Ovogest® (Intervet, Unterschleißheim)
- Insulin-Transferrin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- Lipide (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- L-Glutamin (PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich)
- Mifepriston (RU-38486) (Hoechst-Roussel Uclaf, Paris)
- Proteinase K, Lyophilisat (25 mg/ml) (Boehringer Ingelheim GmbH)
- Prolaktin (Schaf) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- Tamoxifen (4-Hydroxytamoxifen); (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- Trypanblau (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- Trypsin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

3.4.4 Auflistung besonderer Geräte

- Einbettungsautomat (Microm Laborgeräte GmbH, Heidelberg), mit dazugehörigem Histoembedder EG1160 (Leica Instruments GmbH, Nussloch)
- Feuchte Kammer: Blechdose mit Deckel (25 cm × 20 cm × 8 cm) mit angefeuchtetem Zellstoff
- Leitz-Mikroskop DM-RB, F.Nr. 16388 (Leica Mikroskopie GmbH, Wetzlar)
- Heraeus LaminaAir HA2448 GS (Heraeus Instruments GmbH, Hanau)
- Nylon-Gaze 70 µm (MAGV, Rabenau)
- Umkehrmikroskop Leica DMIL (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar)

- Zentrifuge Mikro 22 R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)
- Heraeus Minifuge RF (Heraeus Instruments GmbH, Hanau)
- Heraeus Brutschrank CO₂-Auto-Zero (Heraeus Instruments GmbH, Hanau)
- Zentrifugenröhrchen aus Glas bzw. Kunststoff, 20 ml, steril (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- 12-well-Kulturplatten, steril (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- Zählbrett „ferrari-Statitest“ (Ferrari, Berlin)

3.5 Statistische Auswertung

Soweit zutreffend erfolgte die Darstellung der erhaltenen Messwerte als $\bar{X} \pm SD$.

Beim Gruppenvergleich kam der F-Test (Kolmogoroff/Smirnov), anschließend ANOVA mit Kruskal Wallis zur Anwendung (Statistik-Program: GraphPad InStat3).

4 Ergebnisse

4.1 Elektronenmikroskopie

4.1.1 CL Tag 5 p. o. (Abb. 5 A, B)

Am 5. Tag p. o. sind die Luteinzellen zirka 5-10 μm groß und unregelmäßig geformt. Die Kerne sind groß, besitzen ein oder zwei Nukleoli und enthalten, charakteristisch für die Bildungsphase, fast ausschließlich homogenes Euchromatin. Das Zytoplasma zeigt viele kleine Lipidtröpfchen, die bereits über das ganze Volumen des Luteinzellen-Zytoplasmas, zum Teil auffällig in Paketen kumuliert, zu sehen sind. Davon stellen dunkle, noch kleinere Tröpfchen jüngere Entwicklungsstadien dar. Glattes ER ist am 5. Tag p. o. wenig vorhanden.

Die Luteinzellen sind sehr deutlich durch eine flächenmäßig stark ausgeprägte Extrazelluläre Matrix voneinander getrennt, welche noch vom Corpus haemorrhagicum stammende freie Erythrozyten und Areale mit ödematoiden Resten der Follikelflüssigkeit enthält. Es zeigen sich komplett ausgebildete Kapillaren, die aber keine Perizyten aufweisen, und viel Endothelzellen, die mit wenig Lumeneinschluss sich noch in Entwicklung befinden.

4.1.2 CL Tag 15 p. o. (Abb. 6 A, B)

Am Tag 15 sind die Luteinzellen zirka 20 μm groß, polygonal und sehr eng zueinander gelagert. Die Kerne sind rund und besitzen homogenes Euchromatin. Im Zytoplasma sind Lipidtröpfchen weniger zahlreich als früher, sind verstreut und kommen in verschiedener Größe vor. Als charakteristisch für steroidproduzierende Zellen verfügen die Luteinzellen über zahlreiche Mitochondrien vom Tubulustyp und ein glattes ER.

Die Luteinzellen werden oft durch enge, wenig elektronenabsorbierende Kanäle aus Extrazellulärer Matrix voneinander getrennt, in die Mikrovilli der Luteinzellen hinein

ragen. Diese Zellzwischenräume zeigen auch völlig ausgebildete Kapillaren, an deren Endothelzellen fast jede Luteinzelle streckenweise eng benachbart ist. Im Bereich der Gefäße sind Perizyten nicht selten.

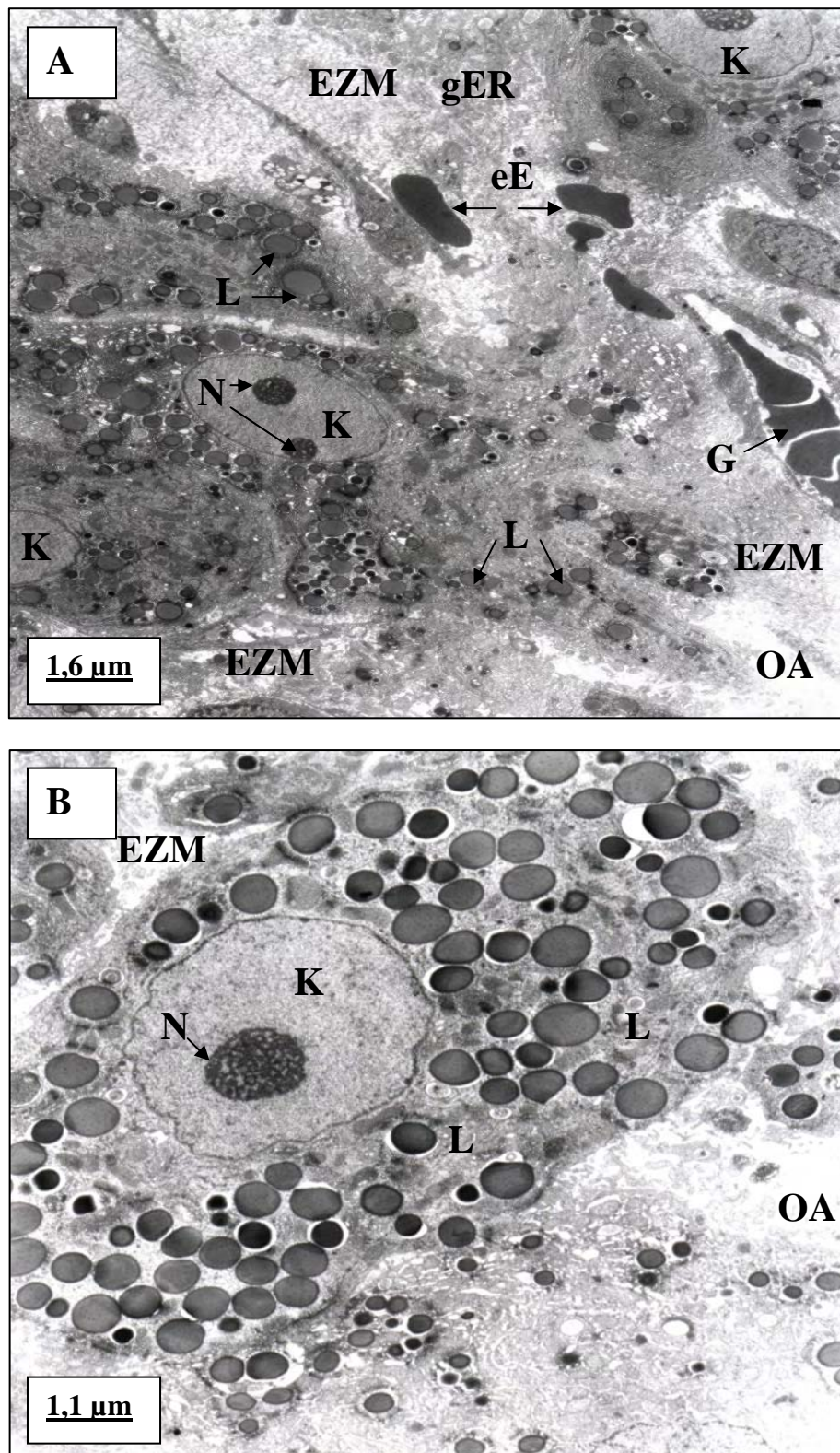


Abb. 5: Elektronenmikroskopische Darstellung des lutealen Gewebes am Tag 5 p. o. (A und B): Kern (K), Nukleolus (N), Lipidtröpfchen (L), glattes Endoplasmatisches Reticulum (gER), Extrazelluläre Matrix (EZM), Ödematoides Areal (OA), Gefäß (G), extravaskuläre Erythrozyten (eE)

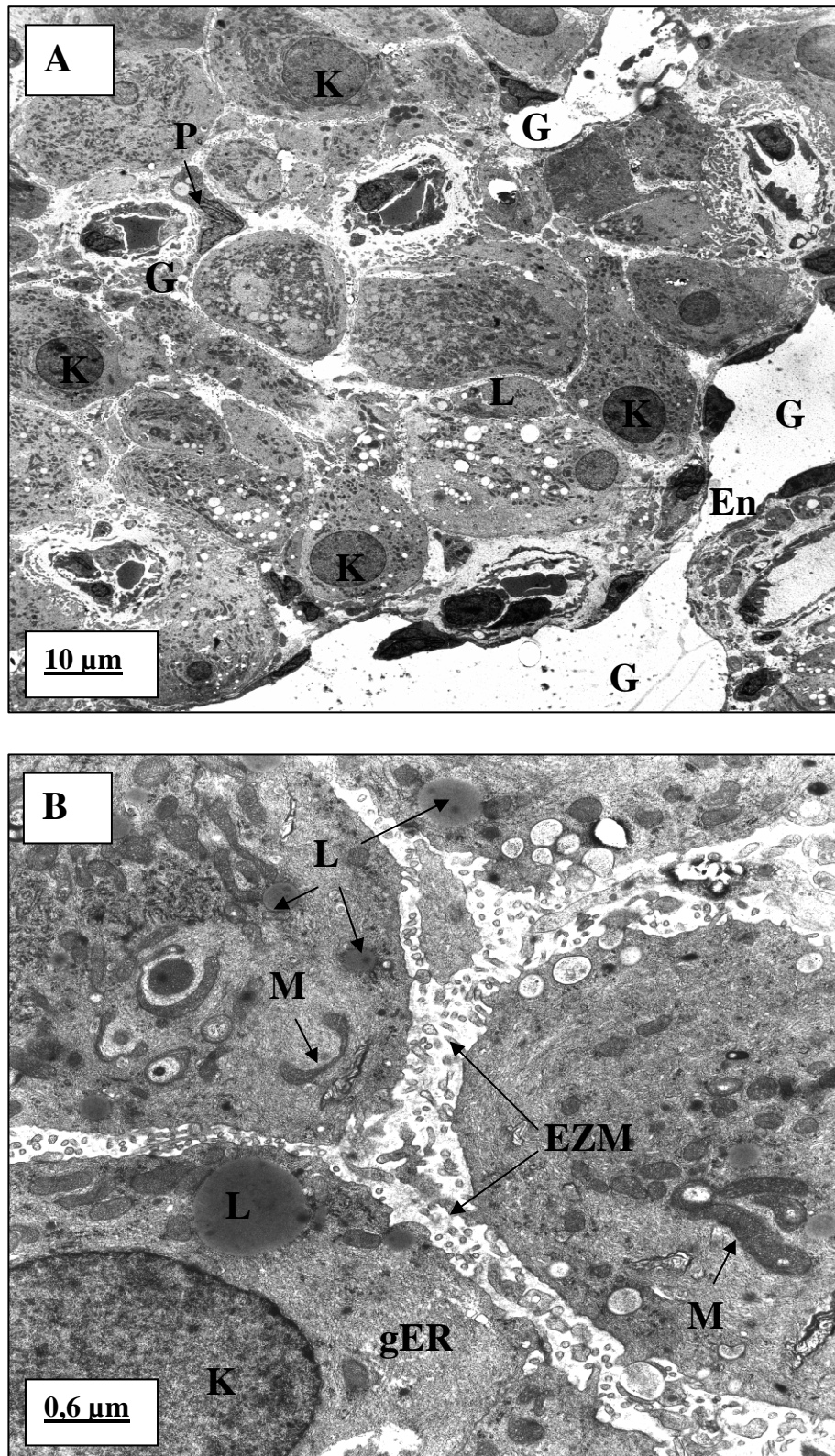


Abb. 6: Elektronenmikroskopische Darstellung des lutealen Gewebes am Tag 15 p. o. (A und B): Kern (**K**), Mitochondrien (**M**), Lipidtröpfchen (**L**), glattes ER (**gER**), Extrazelluläre Matrix (**EZM**), Gefäßlumen (**G**), Endothelzellen (**En**), Perizyt (**P**)

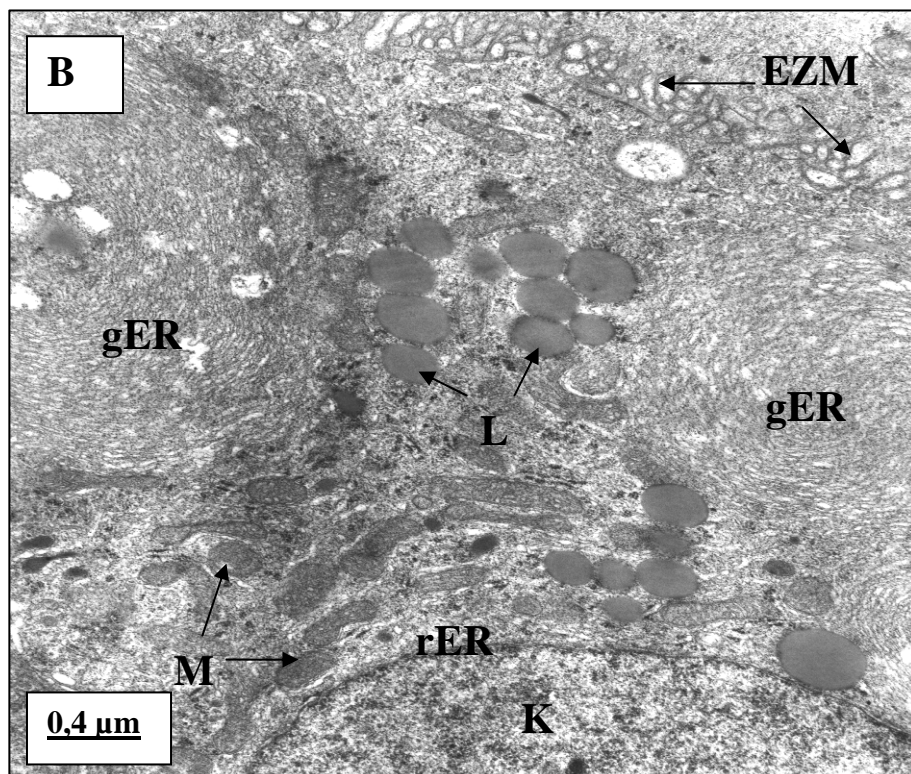
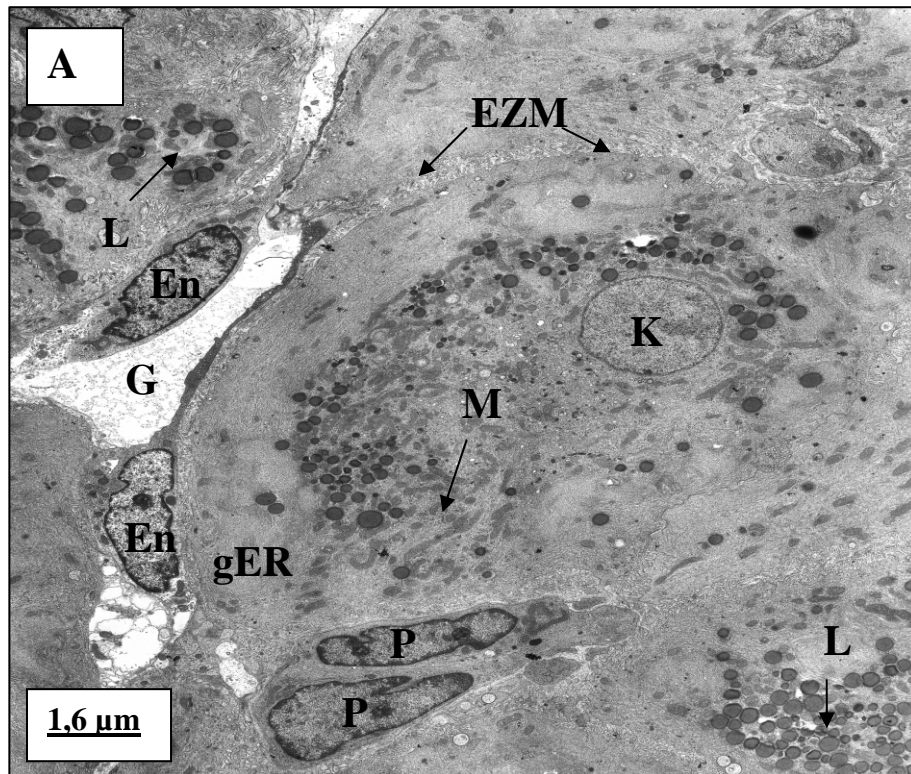


Abb. 7: Elektronenmikroskopische Darstellung des lutealen Gewebes am Tag 30 p. o. (A und B): Kern (K), Mitochondrien (M), Lipidtröpfchen (L), glattes ER (gER), rauhes ER (rER), Extrazelluläre Matrix (EZM), Gefäßlumen (G), Endothelzellen (En), Perizyten (P)

4.1.3 CL Tag 30 p. o. (Abb. 7A, B)

Am Tag 30 sind die polygonalen Lutealzellen noch größer als am 15. Tag p. o. Die Kerne sind rund und besitzen Euchromatin. Die im Zytoplasma vorhandenen Lipidtröpfchen bilden zusammen mit den Mitochondrien Anhäufungen, die vor allem in der Nähe des Kernes lokalisiert sind. Das glatte ER zeigt eine „wirbelähnliche“-Struktur und befindet sich meist im peripheren Bereich der Luteinzelle. Rauhes ER ist selten in Kernnähe.

Die Zellzwischenräume beinhalten immer noch viele Kapillaren mit einem dünnen Endothel. Die Gefäße sind in dieser Phase, im Gegensatz zum Tag 15, öfters mit Perizyten benachbart. Die Extrazelluläre Matrix verkleinert sich, so dass die Luteinzellen in Form von interdigitierenden Mikrovilli miteinander kontaktieren können.

4.1.4 CL Tag 45 p. o. (Abb. 8A, B)

Am Tag 45 charakterisieren sich die Luteinzellen durch einen runden bis ovalen Kern mit homogenem Chromatin. Im Zytoplasma sind verstreute, kleine und große Lipidgranula sowie viele Mitochondrien festzustellen, die letzteren zum Teil mit dünner und langer Form. Das glatte ER zeigt erste degenerative Veränderungen, wie Verhellungen und Verschmelzungsherde, sowie im Zentrum ihrer wirbelartigen Komplexe oft Lipidvakuolen (fettige Degeneration).

Der interzelluläre Abstand zwischen den Luteinzellen nimmt deutlich ab, wobei die Anzahl an Kapillaren sinkt, im Stroma werden zunehmend Kollagenfasern sichtbar. Die damit verbundene Vermehrung des Bindegewebes und die Degenerationsanzeichen des glatten ER im Zusammenhang mit einer Abnahme des Gesamtvolumens des CL sind erste Anzeichen der Rückbildung des Gelbkörpers.

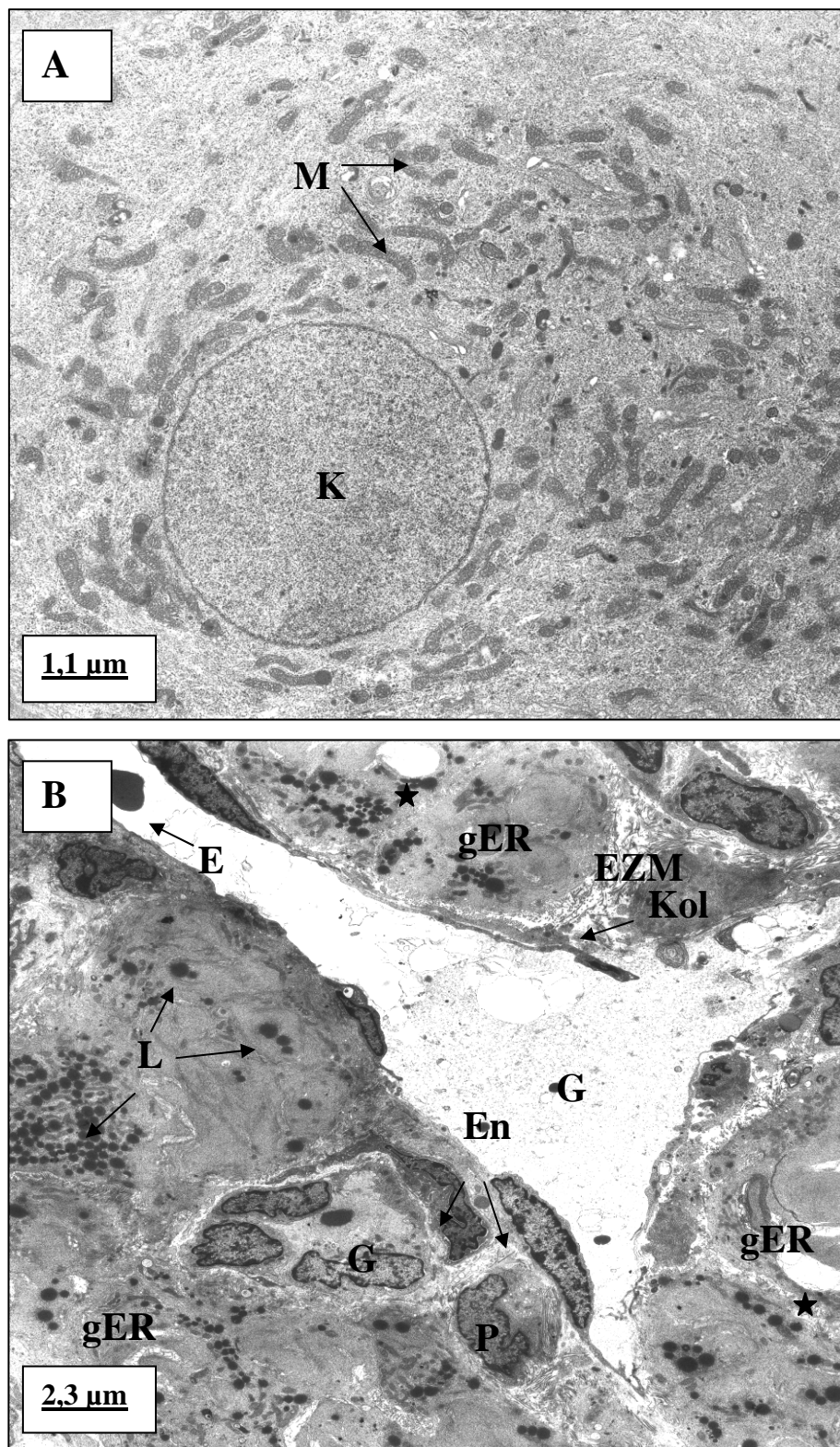


Abb. 8: Elektronenmikroskopische Darstellung des lutealen Gewebes am Tag 45 p. o. (A und B): Kern (K), Mitochondrien (M), Lipidgranula (L), glattes ER (gER), helle Einschmelzungs-Vakuolen (★), Extrazelluläre Matrix (EZM) mit kollagenen Fasern (Kol), Gefäßlumina (G), Erythrozyt (E), Endothelzellen (En), Perizyt (P)

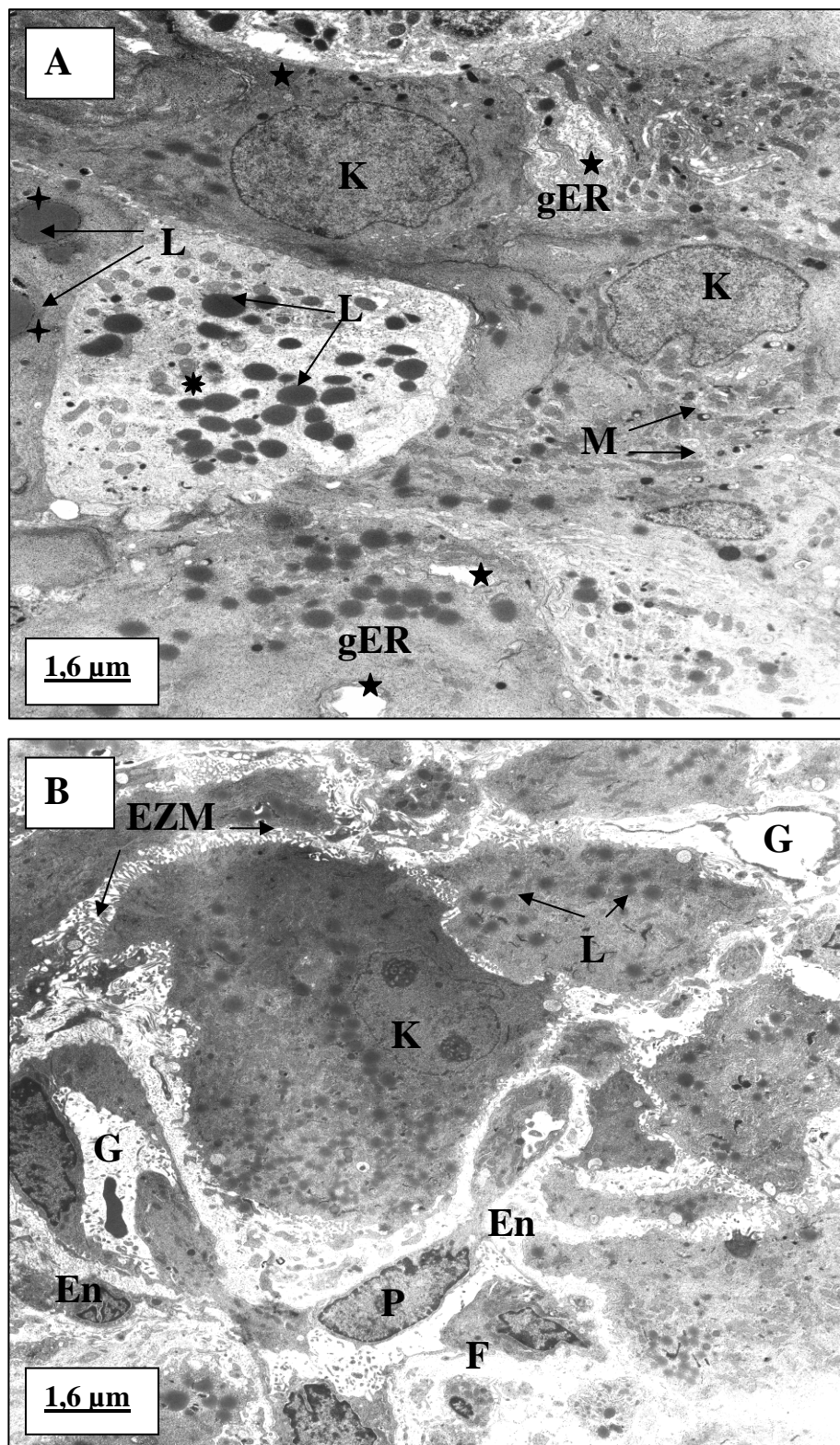


Abb. 9: Elektronenmikroskopische Darstellung des lutealen Gewebes am Tag 60 p. o. (A und B): Kern (**K**), Mitochondrien (**M**), klein- (*****) und großgranuläres (**+**) Lipid (**L**), glattes ER (**gER**) mit vakuoligen Einschmelzungsherden (**★**), Extrazelluläre Matrix (**EZM**), Gefäßlumina (**G**), Endothelzellen (**En**), Fibroblast (**F**), Perizyt (**P**)

4.1.5 CL Tag 60 p. o. (Abb. 9A, B)

Am Tag 60 sind die Luteinzellen sehr unterschiedlich groß und unregelmäßig geformt. Die Zellkerne zeigen beginnende Chromatinkondensation (Heterochromatin) oder sind sogar pyknotisch und haben jetzt oft gelappte Form. Das Zytoplasma enthält neben kleinen vor allem auch große Lipidgranula, die zusammen mit dem umfangreichen glatten ER, das in den Wirbeln hell-vakuolig zerfällt, die deutlich einsetzende fettige Degeneration des CL darstellen. Mitochondrien, über das ganze Zytoplasma zerstreut, sind nur noch wenig vorhanden.

Die Zellzwischenräume vergrößern sich und beeindrucken durch einen starken Zuwachs von Bindegewebszellen und Kollagenfasern. Die Kapillaren sind zum Teil nicht mehr durchlässig (funktionabel) und bilden keine Kontakte mehr zu den Luteinzellen.

4.1.6 CL Tage 75 und 113 p. o. (Abb. 10 A, B)

Vom 75. bis zum 113. Tag (Abb. 10A, B) werden in den Luteinzellen alle Degenerationserscheinungen im Bereich Kern (Lobulierung, Pyknose) und gER (vakuolige Einschmelzungsherde) immer ausgeprägter. Der Nukleus ist nun deutlich lobuliert mit einem großem Gehalt von Heterochromatin. Das glatte ER ist nach wie vor in Wirbeln mit großen Lipidgranula in deren Zentren strukturiert, Gebilde, die am Tag 113 fast das ganze Volumen des Luteinzellen-Zytoplasmas einnehmen.

Die Zellzwischenräume sind ausgeprägt und enthalten neben Kollagenfasern, proliferierende Fibrozyten und Fibroblasten (Abb. 10A). Ab Tag 113 (Abb. 10B) sind dann kaum Abgrenzungen zwischen den Luteinzellen mehr erkennbar und die Extrazelluläre Matrix ist von Bindegewebszellen und Zelltrümmern ausgefüllt. Die Zahl der Kapillaren nimmt deutlich ab, so dass am Tag 113 p. o. nur einzelne Gefäße, oft mit koagulierten Erythrozyten angefüllt, sichtbar sind.

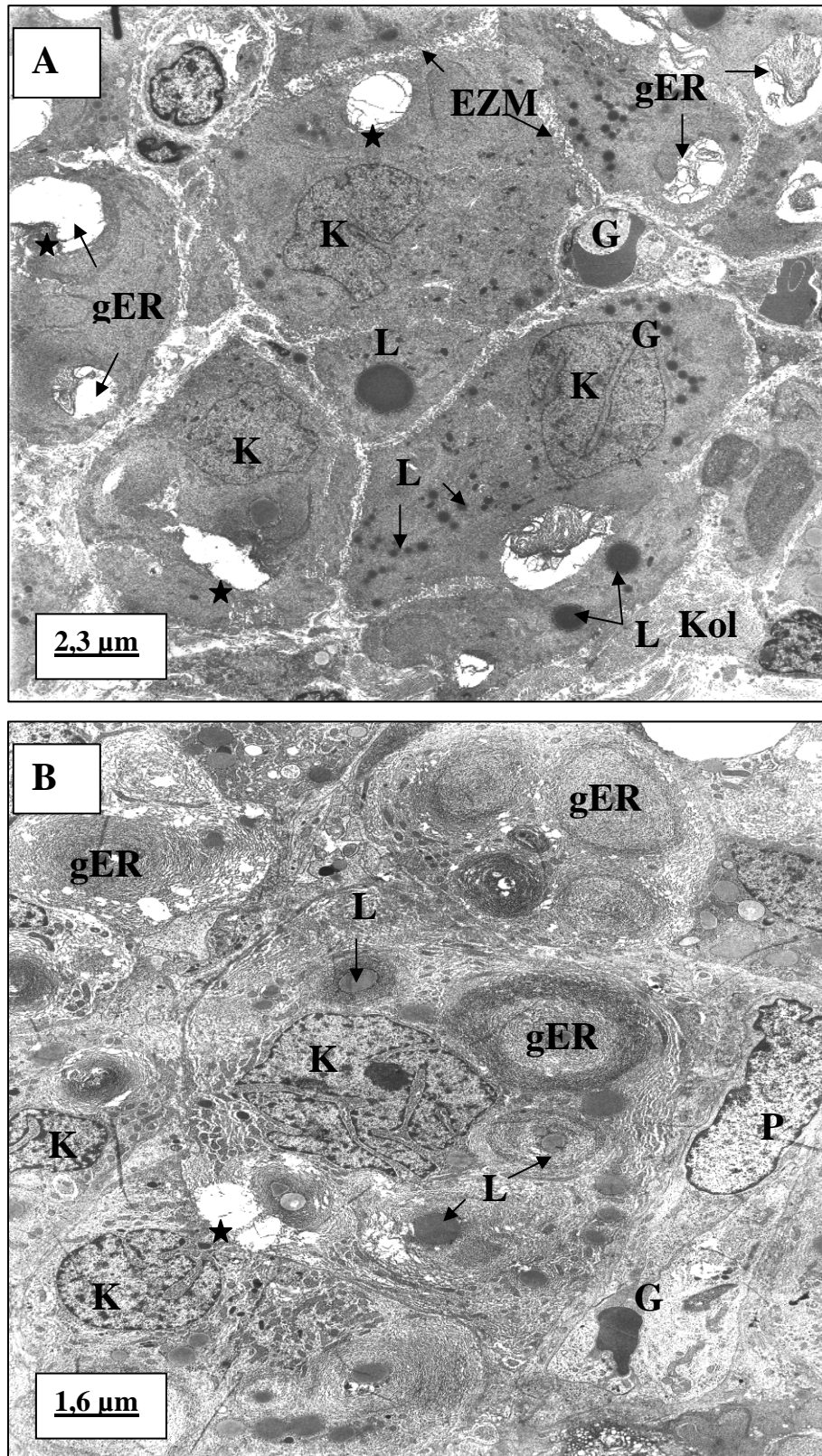


Abb. 10: Elektronenmikroskopische Darstellung des lutealen Gewebes an den Tagen 75 (A) und 113 (B) p. o.: Kern (K), kleine und große Lipidgranula (L), Extrazelluläre Matrix (EZM), verwirbeltes glattes ER (gER) mit vakuoligen Einschmelzungsherden (★), Gefäße (G), Perizyt (P), Kollagen (Kol)

4.2 Nachweis der Apoptose mittels anti-aktiver Caspase-3 Antikörper und TUNEL-Methode

Apoptose-positive Zellen sind durch braunschwarze Anfärbung der Kerne zu erkennen und waren im lutealen Gewebe nur an den Tagen 60-80 p. o. zu sehen. Die positiven Reaktionen konnten überwiegend in Luteinzellen beobachtet werden. Die Zahl positiv gefärbter Zellkerne konnte bei der Caspase-3 Färbung (Abb. 11A, B; 12A, B) in zirka 7 bis 8 Zellen, bei der TUNEL-Methode (Abb. 13A, B; 14A, B) in ungefähr 30 Zellen pro Gewebeschnitt ermittelt werden.

Die positiv angefärbten Zellen wiesen zum großen Teil deutlich morphologische Zeichen von Degeneration auf: Die Kerne waren durch Chromatin-Kondensation charakterisiert und pyknotisch. Das Zytoplasma war in Auflösung begriffen oder teilweise nicht mehr erkennbar. Wegen fortgeschrittener Veränderungen der Zellen war die Lokalisation der positiven Reaktionen oft nicht genau zu ermitteln, aber meistens war die Zuordnung der Färbung zum Kern möglich. Bei Färbungs-Signalen, die im Zytoplasma zu beobachten waren, handelte es sich wahrscheinlich um zerstörte Zellen beziehungsweise Kernreste. In der Positivkontrolle (Lymphknoten vom Hund) konnten zahlreiche positiv reagierende Zellen beziehungsweise Kerne beobachtet werden, die die lichtmikroskopisch erfassbaren morphologischen Charakteristika der Apoptose, wie oben erwähnt, aufwiesen.

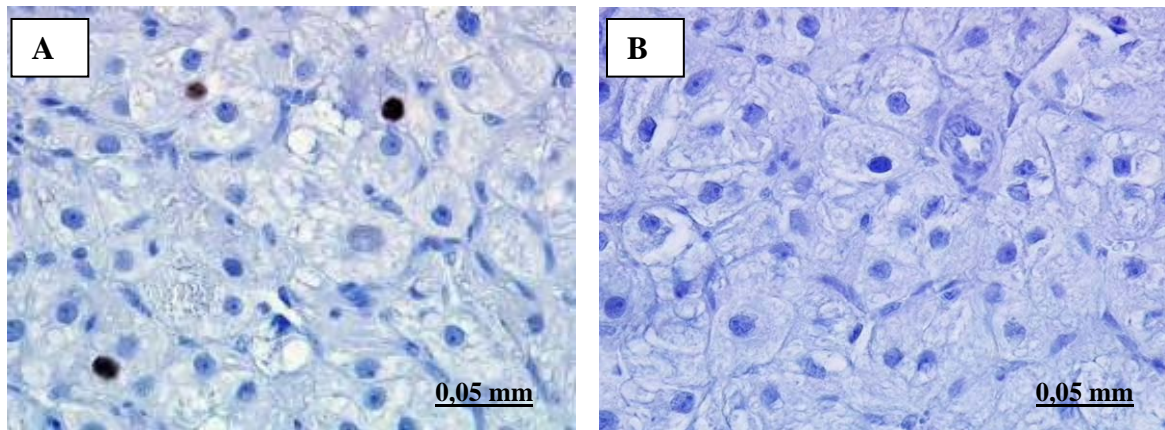


Abb. 11: Lichtmikroskopische Darstellung Caspase-3 positiver Zellen im lutealen Gewebe, Tage 60 und 80 p. o. (A) sowie Negativkontrolle (B)

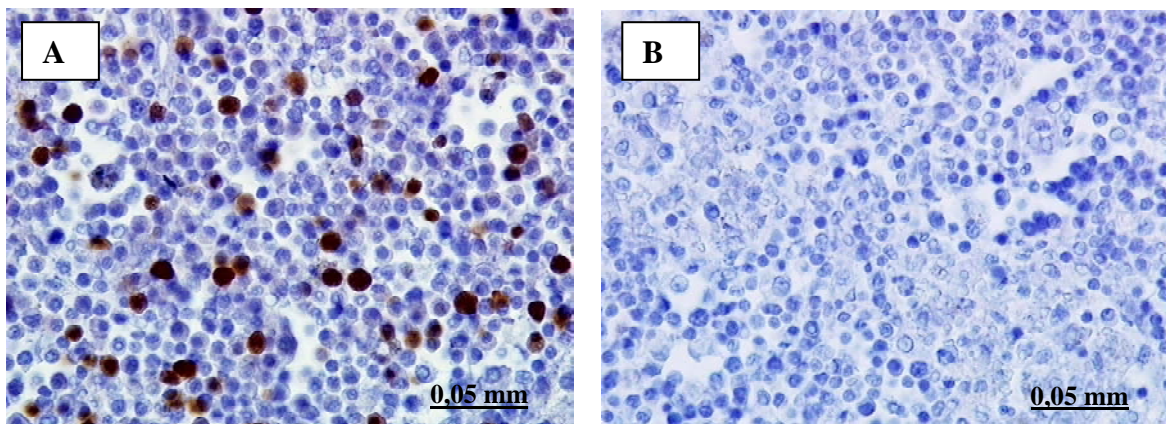


Abb. 12: Lichtmikroskopische Darstellung Caspase-3 positiver Zellen im lymphatischen Gewebe (Lymphknoten vom Hund) (A) sowie Negativkontrolle (B)

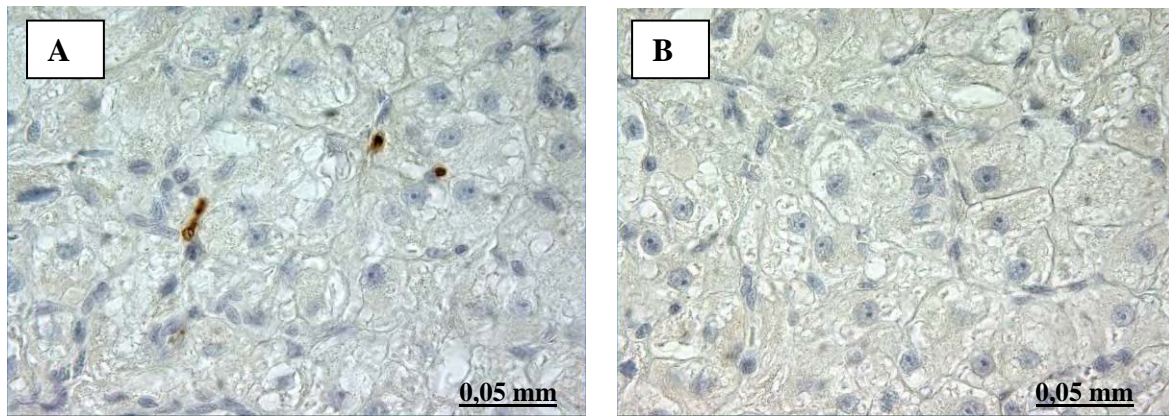


Abb. 13: Lichtmikroskopische Darstellung TUNEL positiver Zellen im lutealen Gewebe, Tage 60 und 80 p. o. (A) sowie Negativkontrolle (B)

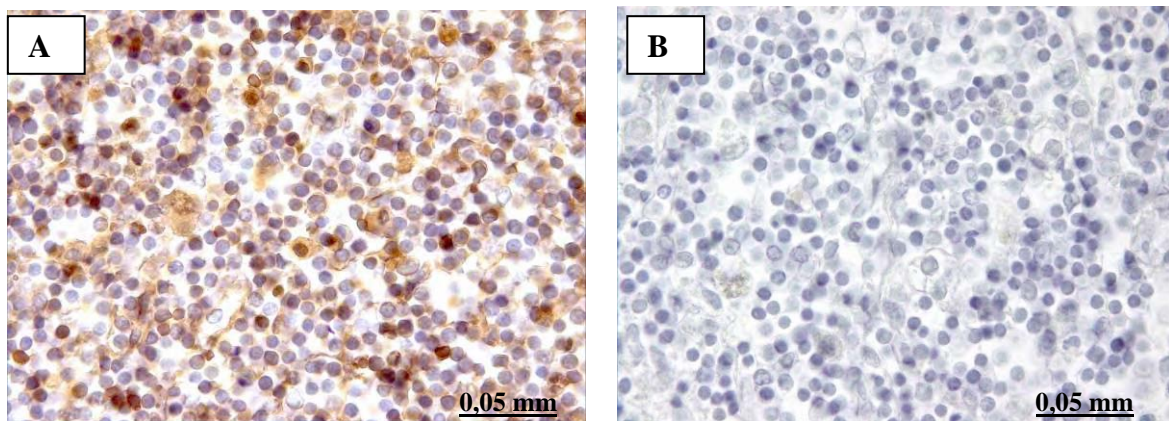


Abb. 14: Lichtmikroskopische Darstellung TUNEL positiver Zellen im lymphatischen Gewebe (Lymphknoten vom Hund) (A) sowie Negativkontrolle (B)

4.3 Primärzellkultur

4.3.1 Gewinnung und Kultivierung der Luteinzellen

Nach enzymatischem Verdau und Färbung mittels Trypan-blau ergab die mikroskopische Prüfung vorwiegend Einzelzellen, von denen einige durch ihre besondere Größe auffielen, daneben zeigten sich auch Aggregate von mehreren Zellen. Die Zahl nicht gefärbter, das heißt lebender Luteinzellen, lag bei allen Präparationen bei $\geq 80 \%$.

Nach Aussaat der Zellen ergab sich innerhalb von 24-48 h die erste Adhäsion und Konfluenz. Die primäre Anheftung der Luteinzellen konnte durch Beschichten der Kulturflächen mit Kollagen verbessert werden.

In den ersten 24-48 h der Inkubation nahmen die Luteinzellen, vorher frei im Kulturmedium schwimmend, Kontakt mit der Kulturfläche auf. Sie bildeten Zytoplasmafortsätze, die sich flach ausbreiteten und im Laufe der Inkubationszeit immer kleiner wurden. Neben polygonalen, zytoplasmareichen Luteinzellen waren auch Fibroblasten sichtbar, die eine lange und dünne Form aufwiesen (s. Abb. 15). Die Luteinzellen zeigten in der weiteren Phase der Inkubation eine sehr hohe Teilungsaktivität. Sie waren durch ovale Kerne mit Nukleoli und vielen kleinen Lipid-Vesikeln im Zytoplasma charakterisiert. Im lichtmikroskopischen Bild stellten sich die Luteinzellen aufgrund der starken Proliferation sehr dicht dar (s. Abb. 16). Nach 96 h Inkubationsdauer war fast die ganze Fläche der 12-Well-Kulturplatte mit Luteinzellen zugewachsen, nur vereinzelt fanden sich transparente Bereiche mit Fibroblasten (s. Abb. 17). Die Luteinzellen zeigten am Ende der Inkubationsphase gegenseitige Überlappung ihrer Zytoplasmafortsätze und waren nicht mehr vollständig auf der Kulturfläche angeheftet.

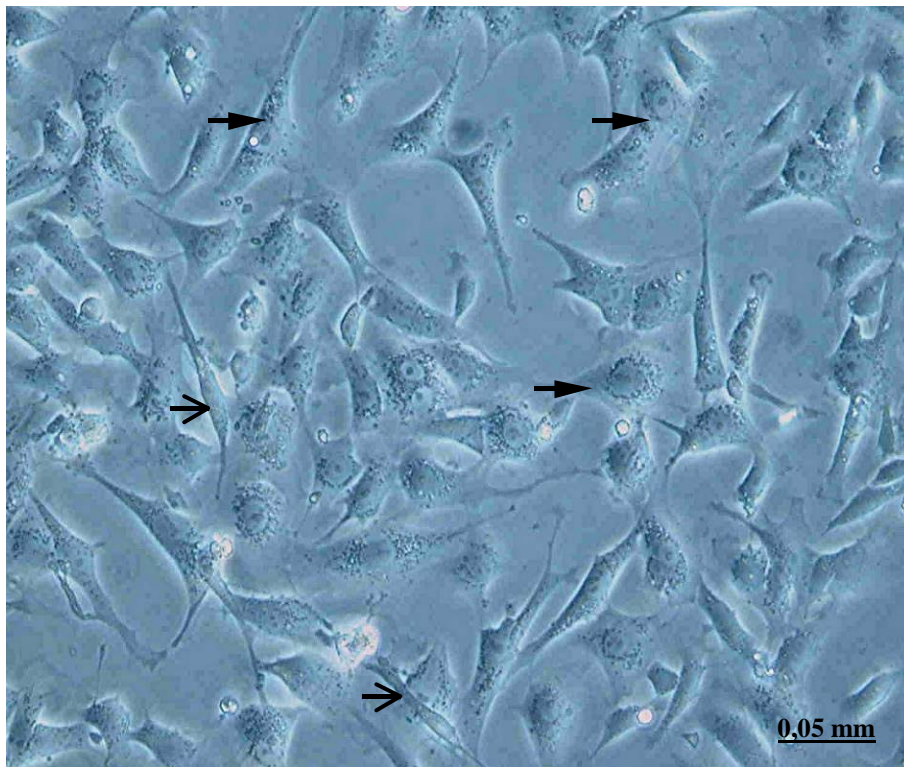


Abb. 15: Zellkultur CL Hund, 5. Tag p.o., 48 h nach Gewebepräparation: Luteinzellen (→), Fibroblasten (→).

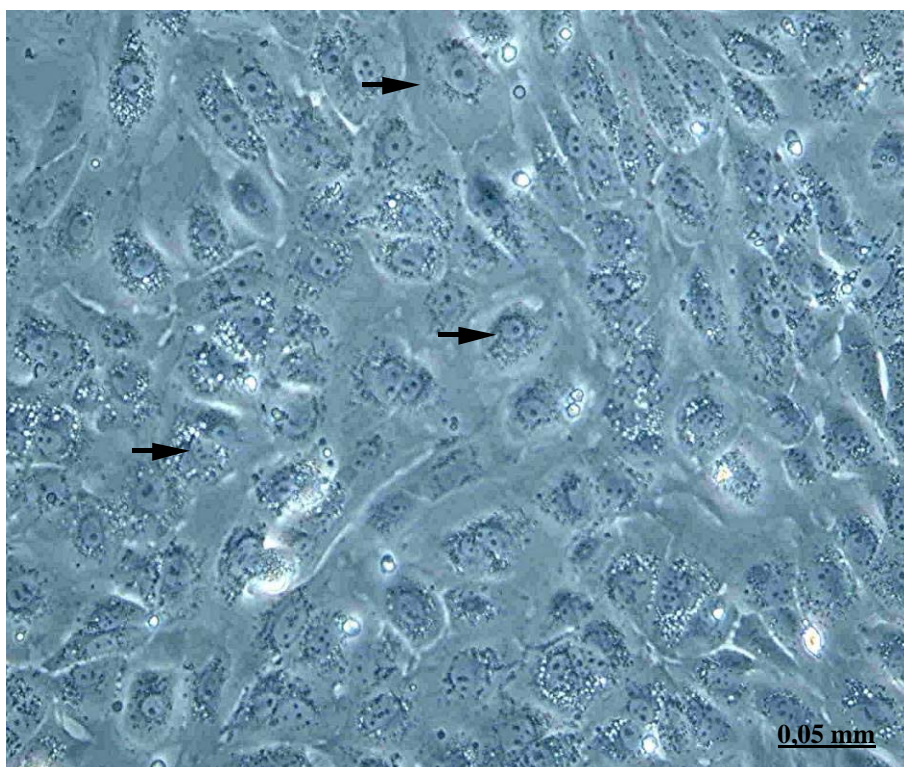


Abb. 16: Zellkultur CL Hund, 5. Tag p.o., 72 h nach Gewebepräparation: Luteinzellen (→).

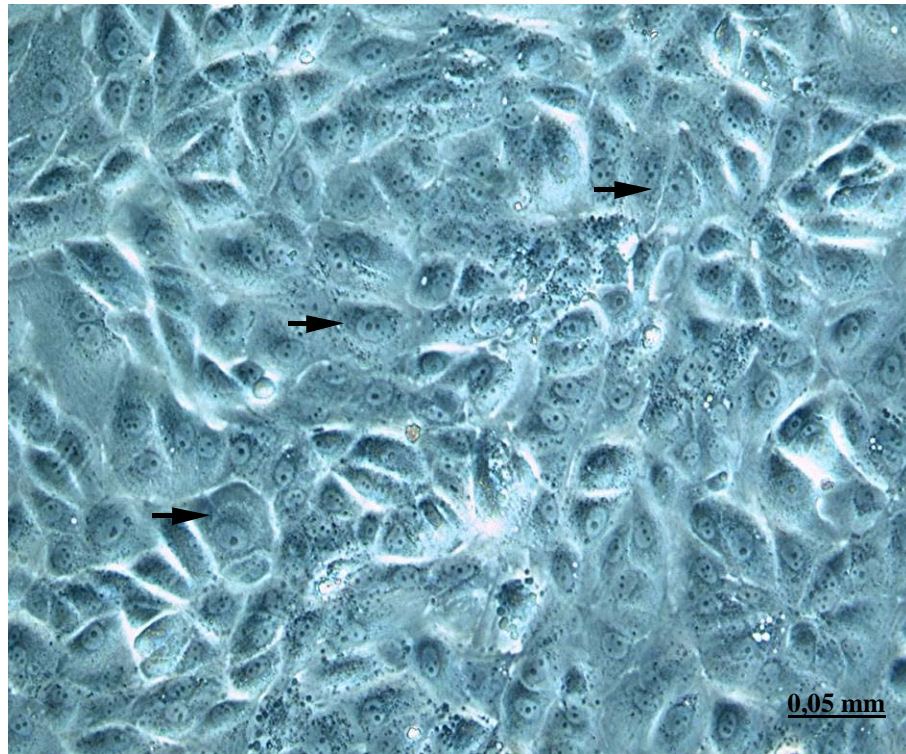


Abb. 17: Zellkultur CL Hund, 5. Tag p.o., 96 h nach Gewebepräparation:
Luteinzellen (→)

4.3.2 Ergebnisse der Progesteronmessung in Kontrollansätzen

Die Ergebnisse der Progesteronmessung in den Zellkulturüberständen aller Kontrollansätze sind in Tab. 1 und Abb.18 zusammengefasst. Obwohl in jeder Kultur die gleiche Zahl an präparierten Zellen eingesetzt wurde (zirka 15×10^4 Zellen pro Well), weisen die in den Überständen gemessenen Progesteronkonzentrationen in Abhängigkeit von Hund z. T. große Unterschiede auf. Der Abfall der Progesteronkonzentrationen vom 48 h- auf den 72 h-Überstand ist mit $p < 0,01$ signifikant, wie auch der Abfall vom 72 h-Überstand auf den 96 h-Überstand ($p < 0,01$).

Tab.1: Kontrollansätze: In den Zellkulturüberständen gemessene Progesteronkonzentration; ng/ml; Mittelwerte der Doppelansätze bzw. $\bar{X} \pm SD$ bei Vierfach-Ansätzen.

CL-Inkubation, Tag 5 p. o.				
Hündinnen:	n	Progesteron (ng/ml)		
		48 h	72 h	96 h
Duna	2	264,1	47,4	19,9
Jacky	2	190,7	23,1	4,6
Tini	4	422,77 \pm 46,7	59,27 \pm 20,6	38,64 \pm 11,8
Kyra	2	422,1	77,5	46,8
Lucy	4	596,5 \pm 46,6	115,3 \pm 8,5	81,7 \pm 12,9
Dekla	2	344,5	35,3	10,2
Thelma A	2	6,5	3,7	4,4
Thelma B	2	6,7	5,1	4,95
Erbsi	2	298,4	53,7	20,2

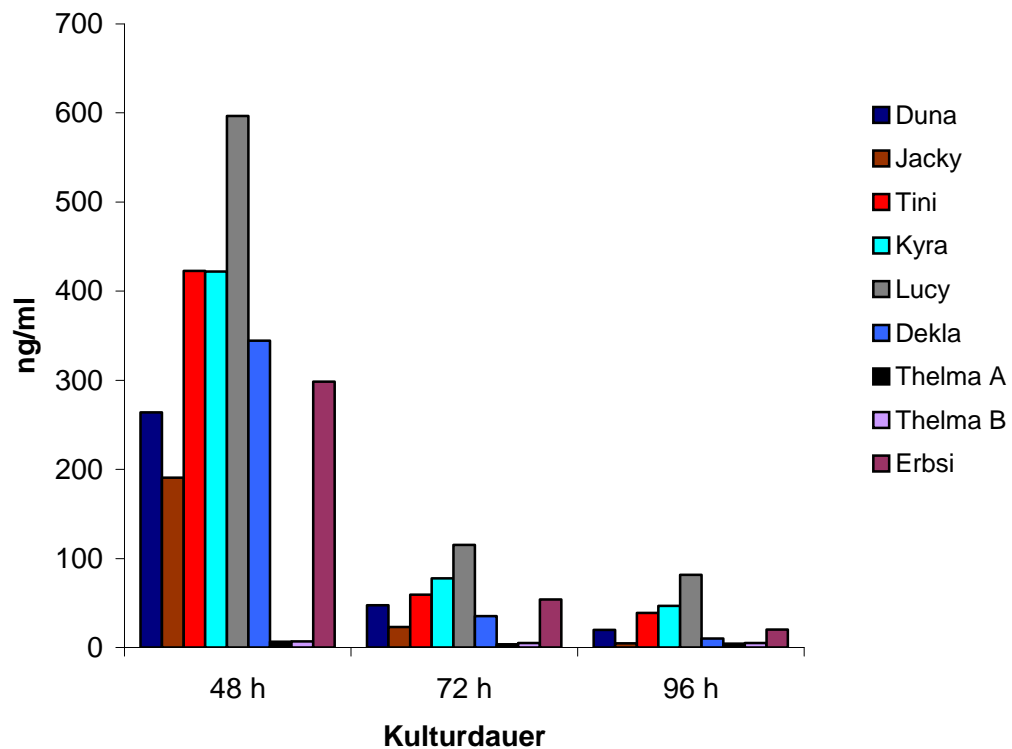


Abb. 18: Kontrollansätze: Abfall der Progesteronkonzentration in den Zellkulturüberständen.

4.3.3 Ergebnisse der Progesteronmessung nach alleinigem Zusatz von RU-38486 und 4-Hydroxytamoxifen

Wie Tab. 2 zeigt, konnten im vorliegenden Versuch weder für RU-38486 noch für 4-Hydroxytamoxifen eine Beeinflussung der Progesteronkonzentration gezeigt werden. Bei Zusatz von RU-38486 ergaben sich $4 \times$ höhere und $2 \times$ niedrigere P4-Werte, einmal war die Konzentration praktisch gleich. Nach Zusatz von 4-Hydroxytamoxifen ergaben sich $5 \times$ höhere und $2 \times$ niedrigere Progesteronkonzentrationen. Bei Verwendung des F-Test zeigte sich kein Unterschied ($p > 0,05$).

Tab. 2: Progesteronkonzentrationen (ng/ml; Mittelwerte der Doppelansätze bzw. $\bar{X} \pm SD$ bei Vierfach-Ansätzen) nach Zugabe von RU-38486 und 4-Hydroxytamoxifen

96 h-Inkubation des CL, Tag 5 p. o.				
Hündinnen	n	Progesteron (ng/ml)		
		Kontrolle	RU-38486	4-Hydroxytamoxifen
	2			
Duna		19,95	15,2	20,1
	2			
Jacky		4,6	2,9	2,1
	4			
Tini		38,64±11,82	55,72±39,92	53,76±0,5
	2			
Kyra		46,8	38,2	28,5
	4			
Lucy		81,7±12,9	53,3±0,7	88,6±2,8
	2			
Dekla		10,2	12,6	13,2
	2			
Erbsi		20,2	20,5	23,8

4.3.4 Ergebnisse der Progesteronmessung nach Zusatz von RU-38486 und 4-Hydroxytamoxifen in Kombination mit Cholesterol

Die Ergebnisse sind in Tab. 3 zusammengefasst. Nach Zusatz von Cholesterol ergaben sich in allen Ansätzen erhöhte Progesteronkonzentrationen, die nach Anwendung des F-Tests mit $p > 0,05$ jedoch nicht signifikant waren. Einen darüber hinausgehenden Effekt ließ weder der Zusatz von RU 38486 noch von 4-Hydroxytamoxifen erkennen.

Tab. 3: Mittlere Progesteronkonzentrationen (ng/ml) in den Zellkulturüberständen nach Zugabe von RU-38486 und 4-Hydroxytamoxifen in Kombination mit Cholesterol; (n = 2)

96 h-Inkubation des CL, Tag 5 p. o.				
Hündinnen	Progesteron (ng/ml)			
	Kontrolle	Cholesterol	Cholesterol+ RU-38486	Cholesterol+ 4-Hydroxy- tamoxifen
Thelma A	4,4	6,91	7,7	5,5
Thelma B	4,95	8,0	7,3	7,6
Jacky	4,6	10,3	5,8	12,4
Kyra	46,7	89	70,8	89,4
Duna	19,95	37,2	34,3	33,5
Erbsi	20,2	22,3	17	14,9

5 Diskussion

5.1 Ausgangslage und Versuchsziel

Bei der Regression des CL handelte es sich um einen multifunktionell gesteuerten Prozess, der speziesspezifischen Gegebenheiten unterliegt und der speziell beim Hund noch zahlreiche Fragen offen lässt. Ziel vorliegender Arbeit war es, parallel zu Untersuchungen zur Expression des Prostaglandinsystems, steroidogener Enzyme und von Steroidrezeptoren (HOFFMANN et al., 2004a; KOWALEWSKI 2007, 2008a, b), am gleichen und zu definierten Zeitpunkten des Diöstrus/Anöstrus gewonnenen Untersuchungsmaterials (Tage 5, 15, 30, 45, 60, 75, 113 p.o.) durch Erfassung histocytologisch-morphologischer Veränderungen auf elektronenmikroskopischer Ebene sowie durch Erfassung der Apoptose weiterführende Erkenntnisse zur Regression des CL nichtgravider Hündinnen zu erhalten. Weiterhin war geplant, in einem weiterführenden Versuch, in einem „in vitro“ Zellkulturmodell mit Luteinzellen Anhaltspunkte auf eine Bedeutung endogenen Progesterons und Estradiols als autokrine/parakrine Faktoren für die luteale Progesteronsynthese zu erhalten.

Mit einer Dauer von ca. 80 Tagen unterscheidet sich die Lutealphase der ingraviden Hündin nachhaltig von den anderen Tieren, wie z.B. Rind, Stute, Schaf oder Schwein, die eine Diöstruslänge von ca. 14 Tagen aufweisen. Die bei diesen Tieren durchgeführten elektronenmikroskopischen Untersuchungen (GREGORASZCZUK & KRZYSZTOFOWICZ, 1989; FIELDS et al., 1992; BRANNIAN et al., 1993; FIELDS & FIELDS, 1996; AL-ZI'ABI et al., 2002) sind daher zunächst nicht auf den Hund übertragbar, für den nur wenig diesbezügliche Angaben in der Literatur vorliegen (ANDERSEN & SIMPSON, 1973; ABEL et al., 1975a, b; DORE, 1989).

Untersuchungen bei Schaf, Rind, Hase, Hamster, Ratte und Stute haben den programmierten Zelltod (Apoptose) als physiologischen Prozess bei der zyklischen

Regression des CL erkennen lassen (SAWYER et al., 1990; JUENGEL et al., 1993; ZHENG et al., 1994; DHARMARAJAN et al., 1994; McCORMACK et al., 1998; BRUCE et al., 2001; MATSUYAMA et al., 1996; AL-ZI'ABI et al., 2002). Ein weiteres Ziel vorliegender Arbeit war es daher, Anhaltspunkte zur Bedeutung der Apoptose bei der Rückbildung des CL der Hündin zu erhalten. Für diese Untersuchung standen CL der Tage 5, 15, 25, 35, 45 sowie 60-80 p.o. zur Verfügung.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin der Versuch der Etablierung einer Primärzellkultur mit Luteinzellen des Hundes unternommen. Im Hinblick auf die Ergebnisse vorausgegangener Untersuchungen (DE CARVALHO PAPA, 2001), in denen die Expression von Progesteron- und Östrogen-Rezeptoren im CL dargestellt werden konnte, sollten an Hand eines solchen in vitro Systems erste funktionelle Erkenntnisse zur Bedeutung von Progesteron und Estradiol als mögliche parakrine/autokrine Regelfaktoren erhalten werden.

5.2 Diskussion der Ergebnisse der Transmissionselektronenmikroskopie

5.2.1 Proliferation und Regression

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass entsprechend den morphologischen Veränderungen bei der nicht graviden Hündin die Lebensspanne des CL, nach Entstehung aus dem Corpus haemorrhagicum in die Phasen Proliferation und Regression unterteilt werden kann. Die für die Proliferationsphase charakteristischen, an den einzelnen Zellen zu beobachtenden morphologischen Veränderungen sind bis Tag 45 p. o. gut erkennbar, danach häufen sich Anzeichen der Regression, bis diese schließlich überwiegen (Tag 75). Trotzdem sind noch bis zum 75. Tag vereinzelt Luteinzellen zu finden, die der Proliferationsphase zuzuordnen sind.

Nach ALBERTS et al. (2004) sind für die Phase der Proliferation rundliche Kerne mit homogener euchromatinischer Struktur und 1-2 Nukleoli als Hinweis auf eine starke Transkriptionsaktivität charakteristisch. Zahlreichen Mitochondrien vom Tubulustyp und das sehr voluminöse glatte ER bilden die Voraussetzung zur Bereitstellung der notwendigen Enzyme für die Steroidhormonbiosynthese aus Cholesterin; dieses ER lässt zudem einen sehr intensiven Lipidstoffwechsel erkennen (ALBERTS et al., 2004). In den eigenen Untersuchungen wiesen die Luteinzellen am Tag 30 ein Maximum an Lipidtröpfchen auf, ab Tag 45 wurde eine Abnahme beobachtet; zu diesem Zeitpunkt fanden sich die Lipidtröpfchen vor allem in kleiner Form vereinzelt und verstreut im Zytoplasma, wobei sich gelegentlich charakteristische Organellen-Komplexe mit dem glatten ER bildeten (s. Abb 8B). Dieses ultrastrukturelle Gebilde wurde auch in den Luteinzellen der trächtigen Hündin zwischen dem 24. und 37. Tag zum Zeitpunkt maximaler Lipidkonzentrationen im Zytoplasma gefunden und als „Parasomen“ bezeichnet (ANDERSEN & SIMPSON, 1973). Nach diesen Autoren sind Parasomen und Mitochondrien die häufigsten Zellorganellen zum Zeitpunkt der maximalen

Progesteronssekretion. Auf die Bedeutung einer Lipideinlagerung für die Steroidsynthese während der Lutealphase der Hündin machen auch ABEL et al. (1975a, b) und DORE (1989) aufmerksam. Entsprechende Beobachtungen liegen auch für die Katze (GURAYA, 1969), Kuh (PRIEDKALNS & WEBER, 1968), Stute (LEVINE et al., 1979) und das Schwein (MIRECKA, 1969) vor.

Der beobachtete Verlauf der Bildung von Parasomen und Lipideinlagerungen im CL der Hündin deckt sich zeitlich mit dem Verlauf der Progesteronkonzentrationen im peripheren Blut (Abb. 1). Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit Befunden von KLEIN et al. (2001), die bei der Hündin eine den Progesteronverlauf entsprechende Expression des Cell proliferation-associated nuclear antigen (Ki-67-Antigen) feststellen konnte.

Dieser Beobachtung stehen jedoch andere morphologische Befunde gegenüber, welche die Luteinzellen noch über einen längeren Zeitraum, d. h. bis ca. Tag 45 der proliferativen Phase zuordnen (s. S. 48-49).

Die Untersuchungen zeigen weiterhin, dass die Luteinzellen in der Proliferationsphase durch ausgeprägte, während diese Zeit aber immer enger werdende Kanäle von Extrazellulärer Matrix getrennt sind; diese wird von freien oder interdigitierenden Mikrovilli durchdrungen, die den Kontakt zwischen den Luteinzellen sicher stellen. Entsprechende Beobachtungen liegen von DORE, (1989) und ABEL et al. (1975a, b) vor, wobei letztere neben Mikrovilli auch Zellenzwischenkontakte durch gap junctions feststellten.

Die einer Strukturverstärkung des Lutealgewebes dienenden Kollagenfasern in der Extrazellulären Matrix, traten erst gegen Ende der Proliferationsphase, d. h. etwa ab Tag 45 auf. Demnach ist die Struktur der Extrazellulären Matrix im CL der Hündin während der Proliferation noch nicht fest gefügt, was sich begünstigend auf den Stoffwechsel und damit die Größenzunahme der Luteinzellen auswirkt. Gewährleistet wird dies auch durch

ein bis zum 15. Tag p. o. schon maximal entwickelte Netz an Kapillaren; so steht jede einzelne Luteinzelle mit einem Zytoplasmafortsatz direkt mit dem Kapillarendothel in Verbindung. Dies wurde bereits von ANDERSEN & SIMPSON (1973) beschrieben, in den eigenen Untersuchungen erstmals elektronenmikroskopisch bestätigt.

Erste Regressionserscheinungen im Bereich der Luteinzellen wurde in den vorliegenden Untersuchungen bei der Hündin ab Tag 45 p. o. beobachtet. Die Zellen zeigten als Ausdruck einer beginnenden Chromatinkondensation polygonale und pyknotische Kerne, die im späteren Stadium eine Lobulation aufwiesen. Das Zytoplasma wurde vor allem durch das in „wirbelähnlicher“ Struktur degenerierende glatte ER auffällig, welches im Wirbelzentrum oft große Lipidvakuolen einschloss. Neben diesen Lipidvakuolen von beträchtlichem Ausmaß als Ausdruck fettiger Degeneration, bildeten sich Einschmelzungsherde, welche später im Anöstrus zu unregelmäßig geformten, großen Vakuolen anwuchsen. Der interzelluläre Raum nahm nun deutlich ab, wobei die Anzahl an Kapillaren durch Obstruktion und nachfolgende Degeneration sank und zunehmend Bindegewebezellen sowie Kollagenfasern sichtbar wurden.

Dies bestätigt frühere elektronenmikroskopische Befunde von DORE (1989), wobei im Gegensatz zu vorliegenden Untersuchungen die Rückbildung des Gelbkörpers erst ab dem 60. Tag p. o. beschrieben wird. Weiterhin berichtet DORE (1989) über eine Vakuolisierung der Mitochondrien, insbesondere in der Regressionsphase. Diese Beobachtungen, die auch bei der Stute (LEVINE et al., 1979) und Kuh (FIELDS & FIELDS, 1996) gemacht wurden, konnten in vorliegender Untersuchung allerdings nicht bestätigt werden. DORE (1989) berichtet auch über dichte Zytoplasma-Körperchen als charakteristisch für die Regressionsphase, ein Befund der von uns ebenfalls nicht bestätigt werden konnten aber offensichtlich während der lutealen Regression auch bei anderen Spezies gemacht wurde (FIELDS & FIELDS (1996), FRASER (1999) und AL-ZIÁBI

(2002)), dort aber fälschlicherweise wahrscheinlich als sekundäre Lysosomen oder Sekretions-Granula beschrieben worden sind.

Somit bestätigen insgesamt die elektronenmikroskopischen Beobachtungen die Befunde von ANDERSEN & SIMPSON (1973) für die Regression des Corpus luteum graviditatis der Hündin bei Anwendung der Lichtmikroskopie; die Kerne der Luteinzellen waren geschrumpft und zeigten außer der Kernpyknose eine undeutliche Kernmembran und einen hellen perinukleären Bereich. Im Zytoplasma zeigte sich eine Zunahme von Lipidtröpfchen, die unregelmäßig in fast allen Zellen verteilt waren (ANDERSEN & SIMPSON, 1973).

5.2.2 Große- und kleine Luteinzellen

Bisherige Untersuchungen bei Spezies wie Rind (O'SHEA, 1987; O'SHEA et al., 1990; FIELDS et al., 1992), Schaf (FRITZ et al., 1982; FARIN et al., 1986; O'SHEA, 1987; KENNY et al., 1989), Ziege (O'SHEA, 1987), Schwein (LEMON & LOIR, 1977; GREGORASZCZUK & KRZYSZTOFOWICZ., 1989), Ratte (SMITH et al., 1989; McLEAN et al., 1992), Kaninchen (HOYER et al., 1986) und Mensch (OHARA et al., 1987) haben gezeigt, dass die Luteinzellen in zwei Subpopulationen, die großen und die kleinen Luteinzellen, aufgeteilt werden können. Die kleinen Luteinzellen zeigen unregelmäßig geformte Kerne, zahlreiche Mitochondrien vom Tubulus-Typ und viele Lipidtröpfchen, die in allen Zyklusstadien und während der Trächtigkeit sichtbar wurden. Außerdem wurde in den kleinen Luteinzellen eine große Menge an glattem ER beobachtet, das eine wirbelähnliche Struktur besaß (O'SHEA et al., 1979; FIELDS & FIELDS, 1996). Die großen Luteinzellen wurden durch dieselben Zytoplasma-Organellen charakterisiert, zeigten jedoch auch rauhes ER und dichte Zytoplasma-Körperchen, auch Sekretions-Granula genannt, die in den kleinen Luteinzellen nicht festzustellen waren. Darüber hinausgehend wurde eine weitere Unterteilung der großen und kleinen Luteinzellen in α

und β Subtypen vorgenommen (GEMMEL et al., 1974; SAWYER et al., 1979; FIELDS & FIELDS, 1996).

Unsere elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Corpora lutea nicht gravider Hündinnen haben dagegen keinerlei Hinweise auf das Vorkommen großer und kleiner Luteinzellen ergeben. Auch ANDERSEN & SIMSON (1973) berichten auf Grund lichtmikroskopischer Untersuchungen von Corpora lutea gravider Hündinnen über Granulosa- und Theca-Luteinzellen.

5.3 Diskussion der Ergebnisse zur Darstellung apoptotischer Zellen

Apoptotische Signale konnten mittels immunhistochemischer Verfahren (Caspase-3) und TUNEL-Methode im Corpus luteum der nicht graviden Hündin nur an den Tagen 60-80 p.o. nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis entspricht den Befunden der EM, die zeigten, dass die Luteinzellen, abgesehen von den Lipideinlagerungen, über die Hälfte des Diöstrus hinaus morphologisch weitgehend intakt sind.

Während beide Verfahren zur gleichen qualitativen Aussage kommen, ergaben sich gewisse quantitative Unterschiede. So waren bei der Auswertung der Caspase-3-Färbung nur einzelne Zellen Apoptose-positiv, bei der TUNEL-Methode waren apoptotische Zellen dagegen in deutlich größerer Anzahl zu identifizieren (s. Abb. 11, 13). Da eine Fragmentierung des DNA als Artefakt bei der Gewebefixierung und –Vorbehandlung induziert werden kann, werden durch die TUNEL-Methode jedoch möglicherweise falsch positive Signale erhalten.

Sofern eine Zuordnung überhaupt möglich war, wurden Apoptose-positive Signale hauptsächlich im Zellkern gefunden, wobei es sich wahrscheinlich um zerstörte Zellen oder Zellreste handelte. Bei Anwendung der Caspase-3-Antikörper konnten jedoch nicht nur zytoplasmatische, sondern auch positive nukleosomale Signale festgestellt werden, wie

sie auch von BOONE & TSANG (1998) im CL der Ratte und PELUFFO et al. (2005) im CL des Affens feststellten.

Vorliegende Untersuchungen lassen auf eine Beteiligung des kontrollierten Zelltodes bei der Gelbkörper-Regression der nicht graviden Hündin schließen. Auch AIUDI et al., (2004, 2006) berichten nach Anwendung von DNA-laddering und Gel-Elektrophorese über eine Beteiligung der Apoptose bei der Regression der CL zyklischer Hündinnen. Ihr Befund einer Zunahme apoptotischer Zellen im Laufe der Gelbkörperphase hat sich in unseren Untersuchungen jedoch nicht bestätigt, so dass dazu gegebenenfalls weiterführende Untersuchungen notwendig werden. Dies auch deshalb, da nach der bisherigen Befundlage die Apoptose bei der Regression des caninen CL weit weniger von Bedeutung zu sein scheint als bei anderen Spezies.

So wurde die Apoptose als ein wichtiger Regelfaktor der physiologischen Gelbkörperregression bei vielen Spezies wie Mensch, Rind, Schaf, Ratte, Maus und Hamster (JUENGEL et al., 1993; KENNY et al., 1994; ZHENG et al., 1994; DHARMARAJAN et al., 1994; MATSUYAMA et al., 1996; HASUMOTO et al., 1997; GUO et al., 1998; McCORMACK et al., 1998; BRUCE et al., 2001; AL-ZI'ABI et al., 2002) nachgewiesen, wobei sowohl die Expression der Caspase-3 (BOONE & TSANG, 1998; RUEDA et al., 1999; DAVIS & RUEDA, 2002; CARAMBULA et al., 2002; PELUFFO et al., 2005) als auch die nukleosomale DNA-Fragmentierung (JUNGEL et al., 1993; ZHENG et al., 1994; DHARMARAJAN et al., 1994; BACCI et al., 1996; RUEDA et al., 1995; McCORMACK et al., 1998) erfasst wurden. Auch bei einer durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ induzierten Luteolyse konnte bei Mensch, Schaf, Hund, Ratte und Maus (SAWYER et al., 1990; RUEDA et al., 1995; BOONE & TSANG, 1998; FRASER et al., 1999; AIUDI et al., 2004; WANG et al., 2003) eine Zunahme der apoptotischen Luteinzellen beobachtet werden. Auch eine Anwendung von Progesteronrezeptor-Antagonisten führte im Corpus

luteum von Rind (RUEDA et al., 2000) und Ratte (TELLERIA et al., 2001) zu einer Steigerung der Apoptoserate.

Nach Behandlung (Tag 15-30, 31-50 und 51-60 p. o.) gravider Hündinnen mit dem $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Analogon Luprostiol konnten AIUDI et al. (2006) Luteinzellen mit nukleosomaler DNA-Fragmentierung in größerer Anzahl als bei ingraviden Hündinnen während der spontanen Luteolyse feststellen. Auch KOWALEWSKI (unveröffentlichte Daten) beobachtete in der präpartalen Phase mittels Caspase-3-Reaktion eine höhere Zahl positiv gefärbter Luteinzellen. Dagegen konnte HÖFTMANN (2004) im Gelbkörper gravider Hündinnen, die mit Aglepristone und Cloprostenol behandelt wurden, bei Anwendung der Annexin-V und TUNEL-Methode, keine deutlich Apoptose-positiven Luteinzellen feststellen. Auch hier ist die Befundlage demnach widersprüchlich, wobei sich allerdings Hinweise ergeben haben, dass der Apoptose für die präpartale luteale Regression offensichtlich eine größere Bedeutung zukommt als für die Regression des CL der nicht graviden Hündin.

Von RUEDA et al. (2000) und OKUDA et al. (2004) wurde postuliert, dass Progesteron in kultivierten Luteinzellen vom Rind als para/-autokriner Faktor fungiert und auf der Ebene des Progesteronrezeptors die luteale Apoptose hemmt. In Studien am CL der Ratte haben KURANAGA et al. (2000) nachgewiesen, dass Progesteron durch eine Senkung der (Fas) mRNA, ein Molekül der Zellmembran, eine Prolaktin-induzierte Apoptose der Luteinzellen hemmte. Auch für den Hund haben sich Hinweise ergeben, dass lutealem Progesteron und Estradiol-17 β eine Rolle als para/-autokrine Faktoren zukommt (HOFFMANN et al., 2004a).

Es kann daher vermutet werden, dass bei der Gelbkörperregression der nicht graviden Hündin möglicherweise der abfallende Progesteronspiegel einen direkten Einfluss auf die Apoptose hat, die demnach nachgeordnet zum Einsetzen der funktionalen lutealen Regression stehen würde.

5.4 Diskussion der Ergebnisse der Primärzellkultur

In der Literatur konnten bisher keine Untersuchungen zur Primärzellkultivierung der Luteinzellen der Hündin gefunden werden.

Ziel der geplanten Untersuchungen war es, mittels Zellkulturen aus CL, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Ovulation gewonnen worden waren, die Fähigkeit der Luteinzellen zur Progesteron-Synthese zu erfassen und durch Anwendung von selektiven Rezeptorblockern Hinweise auf die Bedeutung lutealen Progesterons und Estradiols als mögliche autokrine/parakrine Regelfaktoren zu erhalten.

Zur Etablierung der Zellkulturen wurden Vorversuche, vergleichend mit CL vom Schwein, durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass sich bei Verwendung des Grundmediums DMEM/Ham's F-12 mit Luteinzellen von Schwein gute Zellkulturen ergaben, gemessen an der Progesteronproduktion und der Entwicklung des Zellrasens. Bei Verwendung von Luteinzellen der Hündin dagegen ließen sich ähnlich gute Ergebnisse nur mit Luteinzellen erreichen, die sich aus CL-Präparationen ergaben, die aus 5 bzw. 10 Tage alten CL stammten. Die Luteinzellen zeigten eine gute Adhäsion und Konfluenz, die im Mediumüberstand gemessenen Progesteronkonzentrationen ließen auf eine Progesteronproduktion schließen. Zur weitere Verbesserung des Inkubationsansatzes wurde dem Grundmedium schließlich noch fetales Kälberserum und – im Hinblick auf ihre Bedeutung als luteotrope Faktoren bei der Hündin (CONCANNON, 1980; OKKENS & BEVERS, 1990; ONCLIN & VERSTEGEN, 1997a) – HCG und Prolaktin zugesetzt.

Bei allen Versuchsansätzen zeigte sich, dass mit dem jeweiligen Medienwechsel nach 48, 72 und 96 Stunden die Progesteronkonzentrationen kontinuierlich abfielen, wogegen sich der Zellrasen aus Luteinzellen noch bis zum Ende der Inkubation (96 h) weiter entwickelte. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die Zellen eine gegenseitige Überlappung ihrer cytoplasmatischen Fortsätze, sie waren nicht mehr vollständig auf der Kulturfläche

angeheftet. Ähnliche Beobachtungen machte GIESE (1999) mit bovinen Luteinzellen; auch er hatte festgestellt, dass mit absinkender Progesteronproduktion die Zelldichte auf den Kulturplatten stieg.

Im Gegensatz zu Untersuchungen mit Primärlutealzellkulturen vom Rind (GREGORASZCZUK, 1985; GIESE, 1999), Schwein (GREGORASZCZUK & ZIEBA, 1994) und Kaninchen (McLEAN et al., 1987; ARIOUA et al., 1997) zeigte sich in den vorliegenden Untersuchungen nach Zugabe von HCG keine messbare Stimulation der Progesteronproduktion. Anders auch als mit Luteinzellkulturen vom Schwein (GREGORASZCZUK, 1983; CIERESZKO et al., 1998) ergab sich auch nach Zugabe von Prolaktin keine stimulierende Wirkung. Auch der Zusatz von Cholesterol zeigte keinen an der Progesteronkonzentration im Überstand messbaren signifikanten Effekt.

Diese Befunde weisen auf eine besondere Problematik bei der Arbeit mit Luteinzellkulturen vom Hund hin. Die Tatsache, dass Primärzellkulturen erfolgreich nur mit 5 bzw. 10 Tage alten CL angesetzt werden konnten, lässt darauf schließen, dass im weiteren Verlauf des Diöstrus die Luteinzellen ihre Fähigkeit zur Mitose verlieren. Dieser funktionelle Verlust scheint bereits vor den ersten morphologisch erkennbaren und auf einen Verlust der auf die proliferativen Eigenschaften hindeutenden Kriterien aufzutreten. So ergaben die eigenen EM-Untersuchungen eine Dauer der proliferativen Phase bis ca. Tag 30/45.

Unklar ist auch, ob sich die in den Überständen gemessenen Progesteronkonzentrationen aus einer aktiven sekretorischen Leistung der Luteinzellen ergeben haben oder lediglich aus dem Übergang von intrazellulär gespeichertem Progesteron in das Kulturmedium. Für letztere Vermutung spricht der starke Abfall der Progesteronkonzentration vom 48 h- zum 72 h-Überstand und die Tatsache, dass ein Cholesterolzusatz ebenfalls keine signifikante Steigerung der Progesteron-Synthese bewirkte (s. Tab. 3).

Die Tatsache, dass weder HCG noch PRL einen eindeutig nachweisbaren Effekt auf die Progesteron-Synthese hatten, kann mit der Tatsache erklärt werden, dass im ersten Drittel des Diöstrus die luteale Progesteron-Synthese unabhängig von Gonadotropin erfolgt (CONCANNON 1980, CONCANNON et al., 1987; OKKENS et al., 1986). Zum Zeitpunkt der Durchführung der Untersuchungen war noch nicht bekannt, dass in dieser Phase möglicherweise PGE₂ luteotrop wirkt, wie sich aus hier durchgeführten Untersuchungen von KOWALEWSKI et al. (2008b) ergab.

In Primärzellkulturen aus CL vom Schwein konnten PITZEL et al. (1990) nach einem Zusatz von Tamoxifen eine Erhöhung der Progesteronkonzentration im Kulturmedium messen. EYSTER & CLARK (1989) stellten fest, dass Tamoxifen in humanen CL-Kulturen negativ auf die Proteinkinase C (PKC) wirkt und dadurch den Transport von Cholesterol für die Progesteronsynthese stimuliert. Damit ergeben sich Hinweise auf eine die Progesteronproduktion hemmende Wirkung von Estradiol.

Bei in-vitro Kulturen mit humanen Granulosazellen wurde nach Zugabe von RU 38486 die Aktivität der 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (3 β -HSD) unterdrückt und dadurch die Progesteronsekretion reduziert (DIMATTINA et al., 1986; VANDEVOORT et al., 2000). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Anwendung von einem Antiprogestin zu einer Zunahme der Apoptoserate im bovinen CL führte (RUEDA et al., 2000). In unseren Untersuchungen konnte dagegen eine Wirkung der kompetitiven Hemmung der Progesteron- und Östrogen-Rezeptoren durch die Zusatz von Mifepriston (RU 38486) und Tamoxifen nicht festgestellt werden, es ergaben sich keine signifikanten Effekte ($P > 0,05$) weder in Richtung Stimulation noch Hemmung.

Dies widerspricht zumindest im Hinblick auf die Wirkung des Antigestagens in vivo Befunden, wo nach Anwendung von Mifepriston und Aglepriston eine Luteolyse beobachtet wurde (BLENDINGER et al., 1997; CONCANNON et al., 1990).

Weiterführende Untersuchungen von KOWALEWSKI und HOFFMANN (2008) sowie von KOWALEWSKI et al. (2006a) haben gezeigt, dass die durch Aglepriston herbeigeführte Luteolyse entsprechend der präpartalen Luteolyse und der zyklischen Regression auf eine reduzierte Verfügbarkeit von StAR und 3 β -HSD zurückzuführen ist.

Ein in-vitro Modell, das ein detailliertes Studium der dabei zugrunde liegenden Effekte gestatten würde, steht derzeit jedoch nicht zur Verfügung. Im Hinblick auf den beobachteten Verlust mitogener Aktivität und der sich im Verlauf des langen Diöstrus ändernden, der Progesteronsynthese zugrunde liegenden biochemischen Vorgänge, resultiert aus diesen Untersuchungen die Empfehlung, weitere in-vitro Versuche nicht mit Zellkulturen sondern mit originären Zellverbänden oder Zellsuspension durchzuführen und auf alle Vorinkubationen zu verzichten.

6 Zusammenfassung

Vorliegenden Untersuchungen lag die Frage zu Grunde, inwieweit die bei der nicht graviden Hündin unabhängig von einem uterinen Luteolysin verlaufende Rückbildung der CL durch elektronenmikroskopisch feststellbare Veränderungen charakterisiert wird, inwieweit dabei apoptotische Signale erkennbar sind und ob in einem in vitro System durch Blockierung der Progesteron- und Östrogenrezeptoren auf eine parakrine/autokrine Wirkung von Progesteron und Estradiol geschlossen werden kann.

Für die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden von 19 Beagle-Hündinnen an den Tagen 5, 15, 30, 45, 60, 75 und 113 post ovulationem (p. o.) die Ovarien mittels Ovariohysterektomie (OHE) entnommen, die CL frei präpariert und anschließend für die Dünnschnitt-Technik weiterbehandelt.

Entsprechend der festgestellten morphologischen Veränderungen kann bei der nicht graviden Hündin im Verlauf des Diöstrus das Erscheinungsbild des CL den Phasen Proliferation und Regression zugeordnet werden. Charakteristisch für die sich bis Tag 45 erstreckende Proliferationsphase sind rundliche Kerne mit homogener euchromatinischer Struktur und 1-2 Nukleoli, zahlreichen Mitochondrien vom Tubulustyp und das sehr voluminöse glatte ER. Die Zellzwischenräume zeigen neben freien Erythrozyten zahlreiche gut ausgebildete Kapillaren, wobei offensichtlich fast jede Luteinzelle einen engen, direkten Kontakt mit den Kapillaren aufweist. Ab Tag 45 zeigt das glatte ER erste degenerative Veränderungen, wie Verhellungen und Verschmelzungsherde, sowie Lipidvakuolen im Zentrum der wirbelartigen Komplexe (fettige Degeneration).

Am Tag 60 zeigen die Zellkerne beginnende Chromatinkondensation (Heterochromatin) oder sind sogar pyknotisch und haben oft gelappte Form.

Vom 75. bis zum 113. Tag werden in den Luteinzellen alle Degenerationerscheinungen im Bereich Kern (Lobulierung, Pyknose) und glattes ER (vakuolige Einschmelzungsherde)

immer ausgeprägter. Der Nukleus ist nun deutlich lobuliert mit großem Gehalt von Heterochromatin. Das glatte ER ist nach wie vor in Wirbeln mit großen Lipidgranula in deren Zentren strukturiert.

Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den wenigen bisher zur Morphologie des CL der Hündin beschriebenen Befunden; allerdings ergeben die eigenen Untersuchungen keinen Hinweis auf die Möglichkeit einer Differenzierung zwischen großen und kleinen Luteinzellen (Granulosa- und Theka-Luteinzellen). Sie haben weiterhin gezeigt, dass die morphologisch feststellbare Luteolyse der funktionalen – gemessen an der Progesteronsekretion – nachhinkt.

Auf das Vorkommen der Apoptose wurden CL untersucht, die zu den Tagen 5, 15, 25, 35, 45 und zwischen Tagen 60-80 p. o. mittels OHE von 20 Hündinnen unterschiedlicher Rassen gewonnen und in Paraffin eingebettet worden waren. Die immunhistochemische Detektion erfolgte mittels der Caspase-3- sowie der TUNEL-Methode. Dabei konnten Apoptotische Signale nur an den Tagen 60-80 p. o., also deutlich später als der Beginn der lutealen Regression, nachgewiesen werden.

Beim Versuch der Etablierung eines in vitro Zellkultursystems mit Luteinzellen zeigte sich, dass sich brauchbare Kulturen nur mit CL ergaben, die am Tag 5 und gegebenenfalls auch noch an Tag 10 p. o. gewonnen worden waren. Ein Effekt der Hemmung der Progesteronrezeptoren durch das Antigestagen zeigte sich nicht, ebenso wenig wie ein Effekt nach Hemmung der Östrogenrezeptoren durch Tamoxifen. Die Aussagekraft dieser Befunde ist jedoch limitiert, da das CL der Hündin im Verlauf des Diöstrus unterschiedlichen Regelmechanismen unterliegt und da auch nach Cholesterinzusatz keine signifikante Steigerung der Progesteronsynthese beobachtet werden konnte.

7 Summary

Investigations of the formation, regression and functionality of the corpus luteum in the non pregnant bitch; morphological and biochemical aspects

With the present investigations it was attempted to answer the question how luteolysis in the non pregnant bitch – which is independent of a uterine luteolysin – is manifested by morphological changes as observed by transelectron microscopy. A further question addressed the appearance of apoptotic signals during luteal regression and the role of progesterone and estradiol 17β as paracrine/autocrine factors as experienced by the blocking of progesterone and estrogen receptors in an in vitro system.

19 Beagle bitches were ovario-hysterectomized on days 5, 15, 30, 45, 60, 75 and 113 after ovulation (p.o.), the CL were dissected free and treated for ultrastructural investigation.

According to the observed morphological changes the CL of the non pregnant bitch during diestrous shows the phases of proliferation and regression. The proliferative phase, which lasted until day 45, is characterized by round nuclei with a homogeneous, euchromatic structure and one to two nucleoli, a multitude of mitochondria of the tubulus type and a highly voluminous smooth endoplasmic reticulum. Apart from a few erythrocytes the intercellular space is penetrated by many well developed capillaries, which apparently each luteol cell having a tight contact with one capillary.

First degenerative changes of the smooth endoplasmic reticulum can be observed after day 45; they are characterized by changes in density, fusion loci and lipid-vacuoles in the

center of whirl like complexes (fatty degeneration). Intercellular distance between luteal cells and the number of capillaries decreases, collagen fibres start to appear in the stroma. Beginning with day 60 nuclei show an onset of chromatine condensation (formation of heterochromatine), they become pycnotic and are of lobular structure. These signs of degeneration increase between day 57 and 113 p. o., the nuclei are of distinct lobular form with a high content of heterochromatine. The smooth endoplasmic reticulum is still characterized by whirl like structures with large centrally located lipid granula.

These results are in agreement with few data published so far on the morphology of the CL of the bitch. However, other than reported, our own investigations did not allow distinction between large and small luteal cells (granulosa- and theca-luteal cells); our results further indicate that morphological regression is second to functional regression.

To test for apoptotic signals CL were obtained via ovariectomy from a total of 20 bitches on days 5, 15, 20, 25, 35, 45 and between days 60 and 80 after ovulation. Apoptotic signals were assayed by immunohistochemistry applying the methods of caspases 3 and TUNEL. The detection of apoptotic signals was restricted to days 60 and 80 after ovulation, that is distinctly later than the onset of luteal regression.

When trying to establish an in vitro system for canine luteal cells, it had to be experienced that development of useful cultures was restricted to CL from day 5 and also day 10 after ovulation. When using a day 5 culture system neither the blocking of progesterone or estrogen receptors by mifepristone or tamoxifen, respectively, showed any effects. This observation, however, has to be interpreted very carefully as the CL of the dog is subdue to

changing regulatory mechanisms during diestrous and also because addition of cholesterol had no significant effect on progesterone synthesis.

8 Literaturverzeichnis

Abel JH Jr, McClellan MC, Verhage HG, Niswender GN (1975a)

Subcellular compartmentalization of the luteal cell in the ovary of the dog.

Cell Tissue Res, 158:461-480

Abel JH Jr, Verhage HG, McClellan MC, Niswender GN (1975b)

Ultrastructural analysis of the granulosa-luteal cell transition in the ovary of the dog.

Cell Tissue Res, 160:155-176

Adams JM, Cory S (2002)

Apoptosomes: engines for caspase activation.

Curr Opin in Cell Biol, 14:715-720

Aiudi G, Albrizio M, Caira M, Cinone M (2004)

Apoptosis in bitch corpus luteum during spontaneous and prostaglandin induced luteal regression.

5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction, Aug. 4-6, Sao Paulo, Brazil, Abstract Book, pp 158-160

Aiudi G, Albrizio M, Caira M, Cinone M (2006)

Apoptosis in canine corpus luteum during spontaneous and prostaglandin-induced luteal regression.

Theriogenology, 66:1454-1461.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2004)

Molekularbiologie der Zelle.

WILEY- VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp 1756-1780

Al-zi'abi MO, Fraser HM, Watson ED (2002)

Cell death during natural and induced luteal regression in mares.

Reproduction, 123:67-77

Andersen A, Simpson ME (1973)

The ovary and reproductive cycle of the dog (beagle).

Geron-X Inc, Los Altos, California

Angermüller S, Künstle G, Tiegs G (1998)

Pre-apoptotic alterations in hepatocytes of TNF α -treated galactosamine-sensitized mice.

J Histochem Cytochem, 46:1175-1183

Angermüller S, Schümann J, Fahimi HD, Tiegs G (1999)

Ultrastructural alterations of mitochondria in pre-apoptotic and apoptotic hepatocytes of TNF α -treated galactosamine-sensitized mice.

Ann NY Acad Sc, 887:12-17

Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH (1990)

Apoptosis: The role of the endonuclease.

Am J Pathol, 136:593-608

Arbeiter, K (1994)

Anwendung von Hormonen in der Reproduktion von Hund und Katze.

In: Veterinärmedizinische Endokrinologie (ed F. Döcke). Gustav Fischer Verlag, Jena
Stuttgart, pp 823-841

Arioua RK, Benhaim A, Feral C, Leymarie P (1997)

Luteotropic factors in hyperstimulated pseudopregnant rabbit: II-high sensitivity to hCG of
luteal tissue and small luteal cells.

J Endocrinol, 154:259-260

Bacci ML, Barazzoni AM, Forni M, Costerbosa GL (1996)

In situ detection of apoptosis in regressing corpus luteum of pregnant sow: evidence of an
early presence of DNA fragmentation.

Domest Anim Endocrin, 13:361-372

Bjersing L (1967)

On the ultrastructure of granulosa lutein cells in porcine corpus luteum.

Z Zellforsch Mikrosk Anat, 82:187-211

Bloom W, Fawcett DW (1975)

Female Reproductive System

In: Bloom W & Fawcett DW (eds.): A Textbook of Histology.

WB Saunders Company, Philadelphia London Toronto, pp 871-879

Blendinger K, Bostedt H, Hoffmann B (1997)

Hormonal state and effects of the use of an antiprogestin in bitches with pyometra.

J Reprod Fertil Suppl, 51:317-25.

Boone DL, Tsang BK (1998)

Caspase-3 in the rat ovary: localization and possible role in follicular atresia and luteal regression.

Biol Reprod, 58:1533-1539

Bouchard GF, Solorzano N, Concannon PW, Youngquist RS, Bierschwal CJ (1991)

Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology and elisa for progesterone.

Theriogenology, 35:603-611

Brannian JD, Stouffer RL, Shiigi SM, Hoyer PB (1993)

Isolation of ovine luteal cell subpopulations by flow cytometry.

Biol Reprod, 48:495-502

Bruce NW, Hishah S, Dharmarajan AM (2001)

Pattern of apoptosis in the corpora lutea of rat during the oestrus cycle, pregnancy and in vitro culture.

J Reprod Fertil, 13:105-109

Büsges F (2003)

Immunhistologischer Nachweis von Leukozyten, MHC-II Antigen und Gefäßendothelien am Corpus luteum der Hündin im Verlauf des Zyklus.

Inaugural-Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Giessen.

Caffrey JL, Fletcher PW, Diekman MA, O'Callaghan PL, Niswender GD (1979)

The activity of ovine luteal cholesterol esterase during several experimental conditions.

Biol Reprod, 21:601-608

Carambula SF, Matikainen T, Lynch MP, Flavell RA, Dias Goncalves PB, Tilly JL, Rueda BR (2002)

Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of the ovarian corpus luteum.

Endocrinol, 143:1495-1501

Carroll DJ, Grummer RR, Clayton MK (1992)

Stimulation of luteal cells progesterone production by lipoproteins from cows fed control or fat-supplemented diets.

J Dairy Sci, 75:2205-2214

Cavazos LF, Anderson LL, Belt WD, Henricks DM, Kraeling RR, Melampy RM (1969)

Fine structure and progesterone levels in the corpus luteum of the pig during the estrus cycle.

Biol Reprod, 1:83-106

Chaffkin LM, Luciano AA, Peluso JJ (1993)

The role of progesterone in regulation human granulosa cell proliferation and differentiation in vitro.

J Clin Endocrinol Metab, 76:696-700

Chen S, Zanganolo V, Preutthipan S, Roberts KP, Goodmann SB, Dharmarajan A (1997)

The role of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and estradiol in rabbit corpus luteum progesterone production.

Endocrine, 6:73-77

Chinnalyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM (1995)

FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis.

Cell, 81:505-512

Ciereszko RE, Petroff BK, Ottobre AC, Guan Z, Stokes BT, Ottobre JS (1998)

Assessment of the mechanism by which prolactin stimulates progesterone production by early corpora lutea of pigs.

J Enocrinol, 159: 201-209

Cohen GM (1997)

Caspases: the executioners of apoptosis.

Biochem J, 326:1-16

Concannon PW, Hansel W (1977)

Prostaglandin F₂α induced luteolysis, hypothermia and abortion in beagle bitches.

Prostaglandins, 13:533-54

Concannon PW (1980)

Effects of hypophysectomy and of LH administration on luteal phase plasma progesterone levels in the beagle bitch.

J Reprod Fertil, 58:407-410

Concannon PW, Weinstein P, Whaley S, Frank D (1987)

Suppression of luteal function in dogs by luteinizing hormone antiserum and by bromocriptine.

J Reprod Fertil, 81:175-180.

Concannon PW, Yeager A, Frank D, Iyampillai A (1990)

Termination of pregnancy and induction of premature luteolysis by the antiprogesterone, mifepristone, in dogs.

J Reprod Fertil, 88:99-104

Concannon PW (1993)

Biology of gonadotropin secretion in adult and prepubertal female dogs.

J Reprod Fertil Suppl, 47:3-27

Davis JS, Rueda BR (2002)

The corpus luteum: An ovarian structure with maternal instincts and suicidal tendencies.

Front Biosci, 7:1949-1978

De Carvalho Papa P (2001)

Darstellung von Estradiol-17 β und Progesteronrezeptoren im Corpus luteum der Hündin zu definierten Zeitpunkten im Östrus und Diöstrus.

Inaugural-Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Giessen.

Dharmarajan AM, Goodman SB, Tilly KI, Tilly JL (1994)

Apoptosis during functional corpus luteum regression: evidence of a role for chorionic gonadotropin in promoting luteal cell survival.

Endocrine J, 2:295-303

Dimattina M, Albertson B, Seyler DE, Loriaux DL, Falk RJ (1986)

Effect of the antiprogestin RU486 on progesterone production by cultured human granulosa cells: inhibition of the ovarian 3 beta-hydroxysteroiddehydrogenase.

Contraception, 34:199-206

Dore MAP (1989)

Structural aspects of luteal function and regression in the ovary of the domestic dog.

J Reprod Fertil Suppl, 39:41-53

Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH (1999)

Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis.

Ann Rev Biochem, 68:383-424

Einspanier A, Jarry H, Pitzel L, Holtz W, Wuttke W (1991)

Determination of secretion rates of estradiol, progesterone, oxytocin, and angiotensin II from tertiary follicles and freshly formed corpora lutea in freely moving sows.

Endocrinology, 129:3403-3409.

Elbaum DJ, Keyes PL (1976)

Synthesis of 17beta-estradiol by isolated ovarian tissues of the pregnant rat: aromatization in the corpus luteum.

Endocrin, 99:573-579

Ellis HM, Horvitz HR (1996)

Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*.

Cell, 44:817-829

Endo T, Henmi H, Kitajima Y, Nishikawa A, Manase K, Yamamoto H, Kudo R (1998)

Effects of estradiol and an aromatase inhibitor on progesterone production in human cultured granulosa cells.

Gynecol Endocrinol, 12:29-34

Engel E (2004)

Nachweis der Expression Leukozytärer Zytokine im Corpus luteum der Hündin zu definierten Stadien im Diöstrus.

Inaugural-Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Giessen

Eyster KM, Clark MR (1989)

Nonsteroidal antiestrogen inhibition of protein kinase C in human corpus luteum and placenta.

Biochem Pharmacol, 38:3497-3503

Farin CE, Moeller CL, Sawyer HR, Gamboni F, Niswender GD (1986)

Morphometric analysis of cell types in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle.

Biol Reprod, 35:1299-1308

Feldman EC, Nelson RW (1987)

Canine and feline reproduction.

In: canine and feline endocrinology and reproduction.

WB Saunders Philadelphia, London Toronto, 399-480

Fernandes PA, Bowen RA, Kostas AC, Sawyer HR, Nett TM, Olson PN (1987)

Luteal function in the bitch: changes during diestrus in pituitary concentration and the number of luteal receptors for luteinizing hormone and prolactin.

Biol Reprod, 37:804-811

Fields MJ, Barros CM, Watkins WB, Fields PA (1992)

Characterisation of large luteal cells and their secretory granules during the estrous cycle of the cow.

Biol Reprod, 46:535-545

Fields MJ, Fields PA (1996)

Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrus cycle and pregnancy.

Theriogenology, 45:1295-1325

Fraser HM, Lunn SF, Harrison DJ, Kerr JB (1999)

Luteal regression in the primate: Different forms of cell death during natural and gonadotropin-releasing hormone antagonist or prostaglandin analogue-induced luteolysis.

Biol Reprod, 61:1468-1479

Fritz TA, Mayan MH, Sawyer HR, Niswender GD (1982)

Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum.

Biol Reprod, 27:703-711

Gemmel RT, Stacy BD, Thorburn GD (1974)

Ultrastructural study of secretory granules in the corpus luteum of the sheep during the oestrus cycle.

Biol Reprod, 11:447-462

Giese C (1999)

Langzeitkultur primärer Lutealzellen des bovinen Corpus luteum in einem kontinuierlichen Bioreaktor und Untersuchung der Progesteronproduktion in vitro.

Inaugural-Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Giessen.

Gregoraszczuk EL (1983)

Steroid hormone release in cultures of pig corpus luteum and granulosa cells: effect of LH, hCG and estradiol.

Endocrinol Exp, 17:59-68

Gregoraszczuk EL (1985)

Progesterone and androgen secretion by isolated cultured bovine corpus luteum cells: effect of LH, hCG, PRL, estradiol 17 beta and testosterone.

Folia Histochem Cytobiol, 23:11-16

Gregoraszczuk EL, Krzysztofowicz E (1989)

The corpus luteum of the pig. Scanning electron microscopic study of surface features at different times of incubation.

Acta Biol Hung, 40:145-156

Gregoraszczuk EL, Zieba D (1994)

Effect of estradiol-17 beta on basal and hCG stimulated progesterone secretion by porcine luteal cells isolated in various stages of the luteal cells.

Endocr J, 41:57-62

Guo K, Wolf V, Dharmarajan AM, Feng Z, Bieöke W, Saurer S, Friis R (1998)

Apoptosis-associated gene expression in the corpus luteum of the rat.

Biol Reprod, 58:739-746

Guraya SS (1969)

Some observations on the histochemical features of developing follicle and corpus luteum in the cat and dog ovary.

Acta Vet Acad Sci Hung, 19:351-362

Hasumoto K, Sugimoto Y, Yamasaki A, Morimoto K, Kakizuka A, Negishi M, Ichikawa A (1997)

Association of expression of mRNA encoding the PGF_{2α} receptor with luteal cell apoptosis in ovaries of pseudopregnant mice.

J Reprod Fertil, 109:45-51

Hazzard TM, Stormshake F (1997)

Down-regulation of oxytocin receptors and secretion of prostaglandin F_{2α} after chronic treatment of ewes with estradiol-17β.

Biol Reprod, 56:1576-1581

Hengartner MO (2000)

The biochemistry of apoptosis.

Nature, 407:770-776

Hoffmann B, Kyrein HJ, Ender ML (1973)

An efficient procedure for the determination of progesterone by radioimmunoassay applied to bovine peripheral plasma.

Hormone Res, 4:302-310

Hoffmann B, Gerres S (1989)

Modellversuch zur Darstellung der antigestagenen Wirkung von RU 38486 bei der Hündin.

Wien Tierärztl Mschr, 76:10-14

Hoffmann B, Höveler R, Hasan SH, Failing K (1992)

Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy.

J Reprod Fertil, 96:837-845

Hoffmann B, Schneider S (1993)

Secretion and release of luteinizing hormone during the luteal phase of the oestrus cycle in the dog.

J Reprod Fertil, Suppl, 47:85-91

Hoffmann B, Riesenbeck A, Klein R (1996)

Reproductive endocrinology of bitches.

Anim Reprod Sci, 42:275-288

Hoffmann B, Büttner G (1998)

Biochemical and immunohistochemical investigations on the occurrence of the estrogen receptor in the canine uterus during the oestrus cycle.

Exp Clin Endocrinol Diabetes 106, Suppl. 1:p42

Hoffmann B, Riesenbeck A, Schams D, Steinetz BG (1999)

Aspects on hormonal control of normal and induced parturition in the dog.

Reprod Dom Anim, 34:219-226

Hoffmann B, Büsges F, Engel E, Kowalewski MP, Papa P. (2004a)

Regulation of corpus luteum-function in the bitch.

Reprod Domest Anim, 39:232-240.

Hoffmann B, Büsges F, Baumgärtner W. (2004b)

Immunohistochemical detection of CD4-, CD8- and MHC II-expressing immune cells and endoglin in the canine corpus luteum at different stages of dioestrus.

Reprod Domest Anim, 39:391-395.

Hoyer PB, Keyes PL, Niswender GD (1986)

Size distribution and hormonal responsiveness of dispersed rabbit luteal cells during pseudopregnancy.

Biol Reprod, 34:905-910

Höftmann T (2004)

Endokrinologische, dopplersonographische, histologische und immunhistologische Untersuchungen zur Physiologie und Pathophysiologie der Gelbkörperfunktion der graviden Hündin.

Inaugural-Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin, Tierärztliche Hochschule Hannover

Juengel JL, Garverick HA, Johnson AL, Youngquist RS, Smith MF (1993)

Apoptosis during luteal regression in cattle.

Endocrinology, 132:249-254

Johnson MC, Devoto L, Retamales I, Kohen P, Troncoso JL, Aguilera G. (1996)

Localization of insulin-like growth factor (IGF-I) and IGF-I receptor expression in human corpora lutea: role on estradiol secretion.

Fertil Steril, 65:489-494

Jones LS, Ottobre JS, Pate JL (1992)

Progesterone regulation of luteinizing hormone receptors on cultured bovine luteal cells.

Mol Cell Endocrinol, 85:33-39.

Kaufmann SH, Earnshaw WC (2000)

Induction of apoptosis by cancer chemotherapy.

Exp Cell Res, 10:42-49. Review.

Kaufmann SH & Hengartner MO (2001)

Programmed cell death: alive and well in the new millennium.

Trends Cell Biol, 11: 526-534

Kenny N, Farin CE, Niswender GD (1989)

Morphometric quantification of mitochondria in the two steroidogenic ovine luteal cell types.

Biol Reprod, 40:191-196.

Kenny N, Williams RE, Kelm LB (1994)

Spontaneous apoptosis of cells prepared from the nonregressing corpus luteum.

Biochem Cell Biol, 72:531-536

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972)

Apoptosis: a basis biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.

Br J Cancer, 26:239-257

Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV.(1994)

Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy.

Cancer, 73:2013-2026

Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, Gazdar A, Blenis J, Arnott D, Ashkenazi A (2001)

Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8.

J Biol Chem, 49:46639-46646

Klein R, Papa P, Hoffmann B (2001)

Expression of progesterone and estrogen receptors in the canine corpus luteum in relation to proliferative activity.

Exp Clin Endocrin Diabetes, 109 Suppl. 1, 6.

Kowalewski MP, Mason JI, Howie AF, Morley SD, Schuler G, Hoffmann B (2006a)

Characterization of the canine 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase and its expression in the corpus luteum during diestrus.

J Steroid Biochem Mol Biol, 101:254-262.

Kowalewski MP, Schuler G, Taubert A, Engel E, Hoffmann B (2006b)

Expression of cyclooxygenase 1 und 2 in the canine corpus luteum during diestrus.

Theriogenology 66:1430-1432

Kowalewski MP (2007)

Untersuchungen zur Rolle des Prostaglandin Systems in der Regulation der Corpus Luteum Funktion der Hündin durch Erfassung der Expression von Cyclooxygenase 1 und - 2 (Cox1,-2), Prostaglandin F2 α Synthase (PGFS), Prostaglandin E2 Synthase (PGES) und Prostaglandin F2 α Rezeptor (PGFR).

Inaugural-Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Giessen

Kowalewski MP, Mutembei HM, Hoffmann B (2008a)

Canine prostaglandin F2alpha receptor (FP) and prostaglandin F2alpha synthase (PGFS):

Molecular cloning and expression in the corpus luteum.

Anim Reprod Sci, 107:161-175

Kowalewski MP, Mutembei HM, Hoffmann B (2008b)

Canine prostaglandin E2 synthase (PGES) and its receptors (EP2 and EP4): Expression in the corpus luteum during dioestrus.

Anim Reprod Sci, 109:319-329.

Kowalewski MP, Hoffmann B (2008)

Molecular cloning and expression of StAR protein in the canine corpus luteum during dioestrus.

Exp Clin Endocrinol Diabetes, 116:158-161

Kroemer G, Dallaport B, Resche-Rigon M (1998)

The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis.

Ann Rev Physiol, 60:619-642

Kuranaga E, Kanuka H, Hirabayashi K, Suzuki M, Nishihara M, Takahashi M (2000)

Progesterone is a cell death suppressor that downregulates Fas expression in rat corpus luteum.

FEBS Lett, 466:279-282

Lemon M, Loir M (1977)

Steroid release in vitro by two luteal cell types in the corpus luteum of the pregnant sow.

J Endocrinol, 72:351-359

Levine H, Wight T, Squires E (1979)

Ultrastructure of the corpus luteum of the cycling mare.

Biol Reprod, 20:492-504

Liebermann J, Schams D (1994)

Actions of somatotrophin on oxytocin and progesterone release from the microdialysed bovine corpus luteum in vitro.

J Endocrinol, 143:243-250.

Liebich HG (1990)

Weibliche Geschlechtsorgane.

In: Liebich HG (Hrsg.): Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. 3. Aufl.

Verlag Schattauer, Stuttgart New York, pp 284-293

Lioutas C, Einspanier A, Kascheike B, Walther N, Ivell R (1997)

An autocrine progesterone positive feedback loop mediates oxytocin upregulation in bovine granulosa cells during luteinization.

Endocrinology, 138:5059-5062

Lund SA, Murdoch J, Van Kirk EA, Murdoch WJ (1999)

Mitogenic and antioxidant mechanism of estradiol action in preovulatory ovine follicles: relevance to luteal function.

Biol Reprod, 61:388-392

Matsuyama S, Chang KT, Kanuka H, Ohnishi M, Ikeda A, Nishihara M, Takahashi M (1996)

Occurrence of deoxyribonucleic acid fragmentation during prolactin-induced structural luteolysis in cyclic rats.

Biol Reprod, 54:1245-1251

McCormack JT, Friederichs MG, Limback SD, Greenwald GS (1998)

Apoptosis during spontaneous luteolysis in the cyclic golden hamster: biochemical and morphological evidence.

Biol Reprod, 58:255-260

Mclean MP, Derick RJ, Miller JB (1987)

The effect of human chorionic gonadotropin, dibutyryl cyclic adenosine 3'5'-monophosphate, prostaglandins and 25-hydroxycholesterol on acute progesterone secretion by dissociated rabbit luteal cells in vitro: evidence for independent effect of human chorionic gonadotropins and lipoproteins.

Biol Reprod, 58:255-260

Mclean MP, Nelson SE, Billheimer JT, Gibori G (1992)

Differential capacity for cholesterol transport and processing in large and small rat luteal cells.

Endocrinology, 131:2203-2212

Mirecka J (1969)

Characters of granulo-lutein and theca-lutein cells as shown by lipid metabolism of corpus luteum.

Folia Histochem Cytochem, 7:117-132

Nishiyama T, Tsumagari S, Ito M, Kimura J, Watanabe G, Taya K, Takeishi M (1999)

Immunohistochemical study of steroidogenic enzymes in the ovary and placenta during pregnancy in the dog.

Anat Histol Embryol, 28:125-129

Nohr B, Hoffmann B, Steinetz BE (1993)

Investigation of the endocrine control of parturition in the dog by application of an antigestagen.

J Reprod Fertil, Suppl, 47:542-543.

Ohara A, Mori T, Taii S, Ban C, Narimoto K (1987)

Functional differentiation in steroidogenesis of two types of luteal cells isolated from mature human corpora lutea of the menstrual cycle.

J Clin Endocrinol Metab, 65:1192-1200

Okkens AC, Bevers MM (1990)

Evidence for prolactin as the main luteotropic factor in the cyclic dog.

Veterinary Quarterly, 12:193-201

Okkens AC, Dieleman DJ, Bevers MM, Lubberink AAME, Willemse AH (1986)

Influence of hypophysectomy on the lifespan of the corpus luteum in the cyclic dog.

J Reprod Fertil, 77:187-192

Okuda K, Uenoyama Y, Berisha B, Lange IG, Taniguchi H, Kobayashi S, Kobayashi SI, Miyamoto A, Schams D (2001)

Estradiol-17 β is produced in bovine corpus luteum.

Biol. Reprod, 65:1634-1639

Okuda K, Korzekwa A, Shibaya M, Murakami S, Nishimura R, Tsubouchi M, Woclawek-Potocka I, Skarzynski DJ (2004)

Progesterone is a suppressor of apoptosis in bovine luteal cells.

Biol Reprod, 71:2065-2071

Olson PN, Nett TM, Bowen RA, Sawyer HR, Niswender GD (1989)

Endocrine regulation of the corpus luteum of the bitch as a potential target for altering fertility.

J Reprod Fertil Suppl, 39:27-40

Onclin K, Verstegen JP (1997a)

In vivo investigation of luteal function in dogs: effect of carbegolin, a dopamine agonist and prolactin on progesterone secretion during mid-pregnancy and diestrus.

Domest Anim Endocrinol, 14:25-38

Onclin K, Verstegen JP (1997b)

Secretion patterns of plasma prolactin and progesterone in pregnant compared with nonpregnant diestrus beagle bitches.

J Reprod Fertil Suppl, 51:203-208

O'Shea JD, Cran DG, May MF (1979)

The small luteal cells of the sheep.

J Anat, 128:239-251

O'Shea JD (1987)

Heterogeneous cell types in the corpus luteum of sheep, goats and cattle.

J Reprod Fertil Suppl, 34:71-85

O'Shea JD, Rodgers RJ, McCoy K, D'Occhio MJ (1990)

Ultrastructural cytology of the cyclic corpus luteum of the cow.

Acta Anat, 138:154-165

Pate JL (1996)

Intracellular communication in the bovine corpus luteum.

Theriogenology, 45:1381-1397

Peluffo MC, Young KA, Stouffer RL (2005)

Dynamic expression of caspase-2, -3, -8 and -9 proteins and enzyme activity, but not messenger ribonucleic acid in the monkey corpus luteum during the menstrual cycle.

J Clin Endocrinol Metab, 90:2327-2335

Pitzel L, Jarry H, Wuttke W (1990)

Effects of oxytocin on in vitro steroid release of midstage small and large porcine luteal cells.

Endocrinology, 126:2343-2349

Priedkalns J, Leiser R (1998)

Female Reproductive System.

In: Dellmann HD, Eurell J (Ed.): Textbook of Veterinary Histology. 5. Ed.

Williams & Wilkins, Baltimore Philadelphia London, pp 247-269

Rhodin JAG (1974)

Female Reproductive System.

In: Rhodin JAG (Ed.). Histology.

New York Oxford University Press, London Toronto, pp 712-716

Robinson DG, Ehlers U, Herken R, Herrmann B, Mayer F, Schürmann FW (1985)

Kontrastierung von Schnitten. In: Präparationsmethodik in der Elektronenmikroskopie / eine Einführung für Biologen und Mediziner.

Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo, pp 64-67

Rodway MR, Swan CL, Crelling NK, Gillio-Mcina C, Chedrese PJ (1999)

Steroid regulation of progesterone synthesis in a stable porcine granulosa cell line: a role of progestins.

J Steroid Biochem Mol Biol, 68:173-180

Rueda BR, Wegner JA, Marion SL, Wahlen DD, Hoyer PB (1995)

Internucleosomal DNA fragmentation in ovine luteal tissue associated with luteolysis: In vivo and in vitro analyses.

Biol Reprod, 52:305-312

Rueda BR, Hendry IR, Tilly JL, Hamernik DL (1999)

Accumulation of caspase-3 messenger ribonucleic acid and induction of caspase activity in the ovine corpus luteum following prostaglandin F_{2α} treatment in vivo.

Biol Reprod, 60:1087-1092

Rueda BR, Hendry IR, Hendry III WJ, Stromshak F, Slayden OD, Davis JS (2000)

Decreased progesterone levels and progesterone receptor antagonists promote apoptotic cell death in bovine luteal cells.

Biol Reprod, 62:269-276

Ruiz de Galarreta CM, Fanjul LF, Hsueh AJW (1985)

Progestin regulation of progesterone biosynthetic enzymes in cultured rat granulosa cells.

Steroids, 46:987-1002

Sakahira H, Enari M, Nagata S (1998)

Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation und DANN degradation during apoptosis.

Nature, 391:96-99

Samejima K, Tone S, Kottke TJ, Enari M, Sakahira H, Cooke CA, Durrien F, Martins LH, Nagata S, Kaufmann SH, Earnshaw WC (1998)

Transition from caspase-dependent to caspase-independent mechanism at the onset of apoptotic execution.

J Cell Biol, 143:225-239

Sawyer HR, Abel JH Jr, McClellan MC, Schmitz M. Niswender GD (1979)

Secretory granules and progesterone secretion by ovine corpora lutea in vitro.

Endocrinology, 104:476-486

Sawyer HR, Niswender KD, Braden TD, Niswender GD (1990)

Nuclear changes in ovine luteal cells in response to $\text{PGF}_{2\alpha}$

Domest Anim Endocrinol, 7:229-238

Scaffidi C, Schmitz I, Zha J, Korsmeyer SH, Krammer PH, Peter ME (1999)

Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 Typ I un Typ II cells.

J Biol Chem, 32:22532-22538

Schuler G, Wirth C, Klisch K, Pfarrer C, Leiser R, Hoffmann B (1999)

Immunolocalization of progesterone receptors in bovine placentomes throughout mid and late gestation and at parturition.

Biol Reprod, 61:797-801

Skarzynski DJ, Okuda K. (1999)

Sensitivity of bovine corpora lutea to prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ is dependent on progesterone, oxytocin, and prostaglandins.

Biol Reprod, 60:1292-1298.

Smith CJ, Greer TB, Banks TW, Sridaran R (1989)

The response of large and small luteal cells from the pregnant rat to substrates and secretagogues.

Biol Reprod, 41:1123-1132

Sternberger LA (1967)

Electron microscopic immunocytochemistry: a review.

J Histochem Cytochem, 115: 139-159

Strasser A, O'Connor L, Dixit VM (2000)

Apoptosis signaling.

Ann Rev Biochem, 69:217-245

Tabizadeh S (1995)

Signals and molecular pathways involved in apoptosis, with special emphasis on human endometrium.

Hum Reprod, 1:303-323

Telleria CM, Goyeneche AA, Cavicchia JC, Stati AO, Deis RP (2001)

Apoptosis induced by antigestagen RU486 in rat corpus luteum of pregnancy.

Endocrine, 15:147-155

Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Hantzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW (1997)

A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and Granzyme B.

J Biol Chem, 272:17907-17911

Thornberry NA, Lazebnik Y (1998)

Caspases: Enemies within.

Science, 281:1312-1316

Tonetta SA (1987)

Paracrine control of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase, 17, 20-lyase and aromatase enzyme systems in porcine thecal cells.

Adv Exp Med Biol, 219:665-670

Wang Z, Tamura K, Yoshie M, Tamura H, Imakawa K, Kogo H (2003)

Prostaglandin F $_{2\alpha}$ -induced functional regression of the corpus luteum and apoptosis in rodents.

J Pharmacol Sci, 92:19-27

Williams BJ, Watts JR, Wright PJ, Shaw G, Renfree MB (1999)

Effect of sodium cloprostenol and flunixin meglumine on luteolysis and the timing of birth in bitches.

J Reprod Fertil, 116:103-111

Wuttke W, Spiess S, Knoke I, Pitzel L, Leonhardt S, Jarry H (1998)

Synergistic effects of prostaglandin F2 alpha and tumor necrosis factor to induce luteolysis in the pig.

Biol Reprod, 58: 1310-1315

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR (1980)

Cell death: the significance of apoptosis.

Int Rev Cytol, 68:251-306

Wyllie AH (1992)

Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview.

Cancer Met Rev, 11:95-103

Wyllie AH (1993)

Apoptosis (The 1992 Frank Rose Memorial Lecture).

Br J Cancer, 67:205-208

VandeVoort CA, Overstreet JW, Lasley BL, Stewart DR (2000)

Effects of progesterone receptor blocker on human granulosa-luteal cell culture secretion of progesterone, estradiol and relaxin.

Biol Reprod, 62:200-205

Yuan J, Horvitz HR. (1992)

The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death.

Development, 116:309-320.

Zheng J, Fricke PM, Reynolds LP, Redmer DA (1994)

Evaluation of growth, cell proliferation, and cell death in bovine corpora lutea throughout the estrous cycle.

Biol Reprod, 51:623-632

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd Hoffmann bedanke ich mich herzlich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit sowie für seine Geduld.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Rudolf Leiser möchte ich mich für seine Unterstützung und ständige Gesprächsbereitschaft bei Abklärung morphologischer Fragestellungen, insbesondere bei der Auswahl der Fotos, bedanken.

Frau Dr. R. Klein möchte ich ganz herzlich danken für die freundliche Betreuung am Anfang der Arbeit, ihre Diskussionsbereitschaft und jederzeit gewährte schnelle Hilfe bei großen und kleinen Problemen.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Frau Sabine Feller für die freundschaftliche Zusammenarbeit und ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei den Aufgaben im Zellkulturlabor.

Bei dem RIA-Labor Team möchte ich mich für die immer hilfsbereite und geduldige Einführung in die Labortechniken und die stets gewährte Hilfe bedanken, insbesondere danke ich Herrn W. Damm für seine Hilfsbereitschaft bei der Lösung zahlreicher Computerprobleme.

Frau M. Bach möchte ich ganz besonders für ihre Unterstützung und mütterliche Betreuung danken.

Allen Mitarbeitern der Professur für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung II danke ich für das freundliche Arbeitsklima, die allseitige Unterstützung und die wertvollen Ratschläge bei vielen Problemen. Bei Frau Dr. Carolin Ludwig bedanke ich mich für ihr Verständnis und ihr Korrekturlesen während der Anfertigung dieser Arbeit.

Frau Sigrid Kettner aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und – Embryologie danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei fototechnischen Aufgaben.

Herrn Dr. L. Konrad aus der Frauenklinik in Giessen danke ich für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

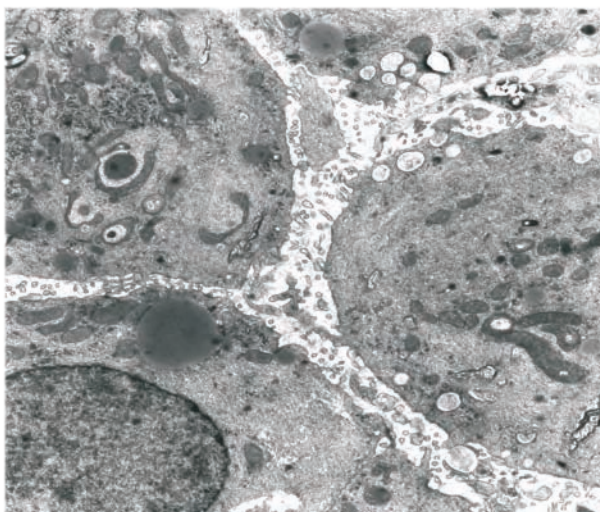
Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinen Geschwistern, die mich immer wieder unterstützt und motiviert haben.

Zuletzt möchte ich meine Frau Viola, meinem Sohn Jacob und meiner Tochter Amelie für ihr Verständnis, ihre liebevolle moralische Unterstützung und für ihr Dasein danken.

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Giessen, den.....



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5451-2



9 1 7 8 3 8 3 5 1 9 3 4 5 1 1